

Université de Sherbrooke

**COORDINATION**  
**DEGLUTITIONS NON NUTRITIVES-RESPIRATION**  
**LORS D'UN STRESS POSTNATAL**  
**CHEZ L'AGNEAU NOUVEAU-NÉ:**  
**Effets de l'hypoxie/hypercapnie et de la fumée secondaire**

Par

Charles Duvareille

Département de physiologie

Thèse présentée à la faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention  
du grade Philosophiae doctor (Ph.D.) en physiologie.

Sherbrooke, Québec, Canada

Mai 2012

Membres du jury d'évaluation :

1. Louis Gendron PhD ; directeur du programme de physiologie (FMSS, physiologie)
2. Jean-Paul Praud MD, PhD ; directeur de thèse (FMSS, physiologie)
3. Arnaud Gagneur MD, PhD; membre extérieur au programme (FMSS, pédiatrie)
4. Vincent Joseph PhD ; membre extérieur à l'université (Université Laval, pédiatrie)



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-94436-3*

*Our file Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-94436-3*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

# Canada

**COORDINATION DEGLUTITIONS NON NUTRITIVES-RESPIRATION LORS  
D'UN STRESS POSTNATAL CHEZ L'AGNEAU NOUVEAU-NE:  
Effets de l'hypoxie/hypercapnie et de la fumée secondaire**

Par Charles Duvareille (département de physiologie)

Thèse présentée à la FMSS en vue de l'obtention du grade Philosophiae doctor (Ph.D.) en  
physiologie, université de Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4.

**RESUME:**

En période néonatale, les problèmes d'ordre respiratoire et nutritif comptent parmi les plus fréquents et sont selon certaines études impliqués dans le syndrome de mort subite du nourrisson (SMSN). Ainsi, les déglutitions non-nutritives (DNN) se présentent comme une fonction fondamentale en période néonatale notamment pour la clairance des voies aériennes supérieures des sécrétions salivaires et des reflux laryngopharyngés. Il apparaît plus précisément que la coordination entre DNN et respiration est indispensable pour la prévention des aspirations pulmonaires et la prolongation des apnées. Le but de cette thèse de doctorat est de comprendre et d'analyser l'effet de certains stress respiratoires comme l'hypoxie (Hx 10% O<sub>2</sub>), l'hypercapnie (Hc 5% CO<sub>2</sub>) ou encore la fumée environnementale de cigarette (FEC) sur la fonction de déglutition en terme de fréquence des DNN et de coordination DNN-respiration en tenant compte des stades de conscience.

**METHODE :** Suite à la construction et à la validation d'un système de production et d'exposition à la FEC, un total de 36 agneaux nouveau-nés est instrumenté chroniquement pour l'enregistrement d'un électrocardiogramme, du mouvement des yeux, d'un électrocorticogramme, du flux nasal et de l'activité des muscles thyroaryténoïdiens (constricteurs de la glotte) par téléométrie. Des enregistrements polysomnographiques sont effectués chez les agneaux nouveau-nés sans sédation ni contention exposés en aigu à l'Hx ou l'Hc ou en chronique à la FEC.

**RESULTATS :** L'analyse des données polysomnographiques obtenues chez les agneaux exposés révèle une augmentation de la fréquence des DNN ( $p=0,005$ ) ainsi qu'une augmentation significative de la fréquence des DNN de type ie (commence en inspiration et se termine en expiration) dans tous les stades de conscience en Hc ( $p < 0,001$ ). Paradoxalement, l'Hx n'a pas d'effet sur la déglutition. La FEC, quant à elle, perturbe légèrement la coordination DNN-respiration en sommeil calme (SC) en diminuant les DNN de type i (commence et se termine en inspiration).

**CONCLUSION :** La coordination DNN-respiration semble être une fonction physiologique très robuste et difficilement perturbable dès la période néonatale en regard de son importance capitale dans la prévention des aspirations et de la prolongation des apnées. Cependant, certains stress comme l'Hc et dans une moindre mesure la FEC

semblent être capable de perturber cette coordination. D'autres études seront nécessaire pour caractériser la coordination DNN-respiration.

Mots clés : déglutitions non-nutritives, coordination déglutition-respiration, hypoxie, hypercapnie, fumée environnementale de cigarette, agneaux nouveau-nés.



**COORDINATION DEGLUTITIONS NON NUTRITIVES-RESPIRATION LORS  
D'UN STRESS POSTNATAL CHEZ L'AGNEAU NOUVEAU-NE:  
Effets de l'hypoxie/hypercapnie et de la fumée secondaire**

Par Charles Duvareille (département de physiologie)

Thèse présentée à la FMSS en vue de l'obtention du grade Philosophiae doctor (Ph.D.) en physiologie, université de Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4.

**ABSTRACT:**

Respiratory and nutritive problems are predominant in the neonatal period and might be involved in Sudden Infant Death Syndrome (SIDS). Non-nutritive swallowing (NNS) is essential for clearing upper airway secretions and laryngopharyngeal refluxes, which are especially frequent in the neonatal period. Furthermore, a perfect NNS-breathing coordination is thought to be crucial to prevent lung aspiration and apnea. The overall aim of the present Ph.D. study was to investigate the effect of different respiratory stresses such as hypoxia (Hx 10% O<sub>2</sub>), hypercapnia (Hc 5% CO<sub>2</sub>) and environmental tobacco smoke (ETS) on NNS frequency and on NNS-breathing coordination in the three states of alertness.

**METHODS:** Following the validation of our system to produce and expose animals to ETS, 36 newborn lambs were chronically instrumented to record electrocardiogram, electrocorticogram, eye movement, nasal airflow and electrical activity of the thyroarytenoid muscle (a glottal constrictor) *via* telemetry. Polysomnographic recordings were performed in non-sedated newborn lambs without contention exposed to acute Hx or Hc or to chronic ETS.

**RESULTS:** Our results showed an increase in NNS frequency ( $p=0.005$ ), especially ie-type NNS (beginning in inspiration and finishing in expiration) during all the three states of alertness in Hc condition ( $p<0.001$ ). Furthermore, ETS tended to alter NNS-breathing coordination during quiet sleep (QS) by increasing i-type NNS (beginning and finishing in inspiration). In contrast, Hx had no effect on swallowing function.

**CONCLUSION:** NNS-breathing coordination seems to be hardwired from birth, probably due to its crucial importance to prevent aspiration and apnea prolongation. But few stresses are able to modulate this coordination including Hc and maybe ETS. Other studies need to be address to challenge NNS-breathing coordination.

**Keywords:** non-nutritive swallowing, NNS-breathing coordination, hypoxia, hypercapnia, environmental tobacco smoke, newborn lambs.

## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Anatomie du carrefour aérodigestif : le larynx.....</b>	<b>2</b>
I. Introduction : .....	2
II. Les cartilages du larynx : .....	2
1) Les cartilages impairs :	
2) Les cartilages pairs :	
III. Les ligaments laryngés : .....	4
IV. Les muscles laryngés : .....	5
V. Fonctions du larynx : .....	8
1) Respiration :	
2) Déglutition :	
VI. Différences anatomiques entre les adultes et les nouveau-nés : ....	10
<b>Chapitre 2 : Physiologie de la déglutition .....</b>	<b>13</b>
I. Généralités : .....	13
1) Les phases volontaires :	
2) Les phases involontaires réflexes :	
II. Le contrôle nerveux de la déglutition : .....	16
1) Les afférences sensibles de la déglutition :	
2) Le centre de la déglutition :	
a. Le groupe dorsal de la déglutition (GDD) : le NTS	
b. Le groupe ventral de la déglutition (GVD) :	
3) Les efférences:	

<b>Chapitre 3 : Physiologie de la respiration .....</b>	<b>23</b>
I. Les muscles respiratoires : .....	23
1) Les muscles inspiratoires :	
2) Les muscles expiratoires :	
II. Le contrôle nerveux respiratoire :.....	25
1) Les afférences nerveuses :	
a) Afférences des voies aériennes ; la boucle mécanique:	
i/ Les récepteurs broncho-pulmonaires :	
ii/ Les récepteurs des voies aériennes supérieures:	
b) Afférences chémoréceptrices ; la boucle chémoréflexe :	
i/ Au niveau périphérique :	
ii/ Au niveau central :	
2) Les centres respiratoires :	
3) Les efférences :	
<b>Chapitre 4 : Coordination déglutition-respiration.....</b>	<b>36</b>
I. Indices de l'existence de la coordination déglutition-respiration : ...	36
II. Importance physiologique de la coordination déglutition-respiration :	36
III. Coordination DNN-respiration :.....	37
<b>Chapitre 5 : Stress environnemental et déglutitions.....</b>	<b>43</b>
<b>Chapitre 6 : Objectifs et hypothèses de ce projet de doctorat.....</b>	<b>48</b>
<b>MATERIEL ET METHODES / RESULTATS.....</b>	<b>50</b>
Article 1 : Effects of hypoxia and hypercapnia on non-nutritives swallowing in newborn lambs.....	51
Article 2 : Validation of a new automatic smoking machine to study the effects of cigarette smoke in newborn lambs.....	86
Article 3 : Effects of environmental tobacco smoke on non-nutritive swallowing -respiration coordination in newborn lambs.....	113

<b>DISCUSSION.....</b>	142
<b>Chapitre 1 : préambule à la discussion .....</b>	143
<b>Chapitre 2 : choix du modèle animal ovin et mise en place de deux modèles expérimentaux pour l'étude de l'exposition à l'hypoxie/hypercapnie et à la fumée environnementale de cigarette.....</b>	145
I. Choix du modèle animal ovin :.....	145
II. Mise en place des modèles expérimentaux : .....	147
1) La télémétrie :	
2) Projet hypoxie/hypercapnie :	
3) Projet fumée environnementale de cigarette :	
<b>Chapitre 3 : Effets de l'hypoxie/hypercapnie et de la fumée environnementale de cigarette sur la fonction de déglutition.....</b>	153
I. Effets de l'hypercapnie :.....	153
II. Effets de l'hypoxie : .....	157
III. Effets de la fumée environnementale de cigarette : .....	161
1) Effets de l'hypercapnie :	
2) Effets de l'hypoxie :	
3) Effets de la fumée environnementale de cigarette :	
<b>Chapitre 4 : La coordination DNN-respiration est une fonction physiologique très robuste.....</b>	166
I. Données obtenues chez l'agneau : .....	166
II. Données obtenues chez l'humain : .....	167
III. Influence du type d'analyse : .....	169
IV. L'hypercapnie a un effet réel direct ou indirect via l'hyperventilation ?	
<b>Chapitre 5 : Importance des stades de consciences.....</b>	171
<b>Chapitre 6 : Implications cliniques et perspectives.....</b>	172
<b>Chapitre 7 : Conclusion.....</b>	173
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	174
<b>REFERENCES.....</b>	176

## **LISTE DES TABLEAUX :**

**Tableau 1** : présentation des différences anatomiques des voies aériennes supérieures entre l'adulte et le nouveau-né humain.

## **LISTE DES FIGURES :**

**Figure 1 :** Schéma récapitulatif des différentes régions du carrefour aérodigestif incluant la cavité buccale, le pharynx, le larynx, la trachée et l'œsophage.

**Figure 2:** Anatomie de la région du larynx.

**Figure 3 :** Anatomie du larynx durant l'inspiration en vue céphalique démontrant la position anatomique des structures vestibulaires, ventriculaires et la position des récessus piriformes.

**Figure 4 :** Organisation du centre de la déglutition chez le rat.

**Figure 5 :** Schéma illustrant l'activité électrique issue de la contraction de certains muscles impliqués dans la déglutition selon une séquence temporelle très rigoureuse.

**Figure 6 :** Schéma du principe de l'inhibition réciproque adapté aux motoneurones contrôlant les muscles de la déglutition.

**Figure 7 :** Représentation schématique de l'expérience des circulations céphaliques croisées chez le chien.

**Figure 8 :** Organisation neuronale des centres respiratoires.

**Figure 9 :** Classification descriptive des DNN.

**Figure 10 :** Procédure de calcul de la méthode quantitative de classification des DNN.

**Figure 11 :** Classification descriptive des DNN chez l'agneau nouveau-né à terme à l'éveil.

**Figure 12 :** Modification de la coordination DNN-respiration chez l'humain adulte suite à un stress hypercapnique d'intensité croissante.

**Figure 13 :** Schéma de la théorie du triple risque associée au syndrome de mort subite du nourrisson.

**Figure 14 :** Schéma récapitulatif des effets de l'hypercapnie au niveau salivaire, de la région du larynx, de la respiration et des centres de la déglutition et de la respiration.

**Figure 15 :** Schéma récapitulatif des effets de l'hypoxie au niveau salivaire, de la région du larynx, de la respiration et des centres de la déglutition et de la respiration.

**Figure 16 :** Schéma récapitulatif des effets de la fumée de cigarette ou de la nicotine sur le tractus digestif.

## **LISTE DES ABREVIATIONS:**

ASM : Machine à fumer automatique

BötC : Complexe de Bötzinger

CCPA : Conseil canadien de protection des animaux

CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone

CRF : Capacité résiduelle fonctionnelle

CRV : Colonne respiratoire ventrale

DN : Déglutitions nutritives

DNN : Déglutitions non-nutritives

ETS : Fumée environnementale de cigarette

FEC : Fumée environnementale de cigarette

GDD : Groupe dorsal de la déglutition

GRD : Groupe respiratoire dorsal

GRV<sub>r</sub> : Partie rostrale du groupe respiratoire ventral

GVD : Groupe ventral de la déglutition

IX : Nerf glossopharyngien

KF : Noyau de Kölliker-Fuse

LCR : Liquide céphalo-rachidien

LPB : Complexe parabrachial

mmHg : Millimètres de mercure

NC : Nerfs crâniens

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NMDX : Noyau moteur dorsal du vague

NNS : déglutitions non-nutritives

NTS : Noyau du tractus solitaire

O<sub>2</sub> : Oxygène

pFRG : Noyau parafacial

pré-BötC : Complexe de pré-Bötzinger

RGO : Reflux gastro-œsophagien

RTN : Noyau rétrotrapézoïde

SCM : Sterno-cléido-mastoïdien

SIDS : Sudden infant death syndrome

SIO : Sphincter inférieur de l'œsophage

SMSN : Syndrome de mort subite du nourrisson

SSO : Sphincter supérieur de l'œsophage

V2 : Branche maxillaire du trijumeau

VAI : Voies aériennes inférieures

VAS : Voies aériennes supérieures

VII : Nerf facial

X : Nerf vague

XII : Nerf grand hypoglosse



# **INTRODUCTION**

## **Chapitre 1 : Anatomie du carrefour aérodigestif : le larynx**

### **I. Introduction :**

Le larynx est une structure musculaire creuse avec une armature cartilagineuse et constitue la première partie de l'appareil respiratoire juste avant la trachée. Ainsi, le larynx est délimité en caudal par la trachée, en céphalique par le pharynx qui s'ouvre sur la cavité buccale, en postérieur par l'œsophage et en antérieur par les muscles du cou (figure 1). Pour repère, la glande thyroïde se situe en antéro-caudal par rapport au larynx. Le larynx, structure très mobile, possède notamment une fonction de phonation, une fonction respiratoire mais aussi une fonction de protection des voies aériennes inférieures (VAI) contre les aspirations durant la déglutition (Altschuler, 2001).

### **II. Les cartilages du larynx :**

En plus de sa composante ligamentaire et musculaire détaillée plus tard dans ce chapitre, le larynx se compose de trois cartilages impairs et de trois petits cartilages pairs.

#### **1) Les cartilages impairs :**

Le **cartilage cricoïde** est le plus inférieur des cartilages laryngés. En forme d'anneau, ce cartilage encercle complètement les voies aériennes. Sa partie antérieure très fine forme l'arc cricoïde alors que sa partie postérieure plus large forme la lame capable de s'articuler en supérieur avec les cartilages aryténoïdes et en latéral avec le cartilage thyroïde. De plus, la lame possède en postérieur une crête servant d'attache à l'œsophage.

Le **cartilage thyroïde** en forme de fer à cheval à concavité postérieure ferme l'aspect antérieur du larynx et se compose de deux lames droite et gauche fusionnant sur la ligne médiane pour former l'angle thyroïdien, une structure communément appelée "pomme

d'Adam". La partie postérieure des deux lames s'allonge pour former les cornes supérieures et inférieures. Les cornes inférieures s'articulent avec les facettes articulaires latérales de la lame du cartilage cricoïde, tandis que les cornes supérieures servent d'ancrage avec la grande corne de l'os hyoïde.

Le troisième cartilage, l'**épiglote**, a une forme de feuille qui s'attache par sa tige à la face postérieure de l'angle thyroïdien grâce au ligament thyro-épiglottique. L'épiglotte s'étend par sa partie mobile vers le haut et l'arrière et sa partie supérieure arrive au niveau de la partie pharyngée de la base de la langue.

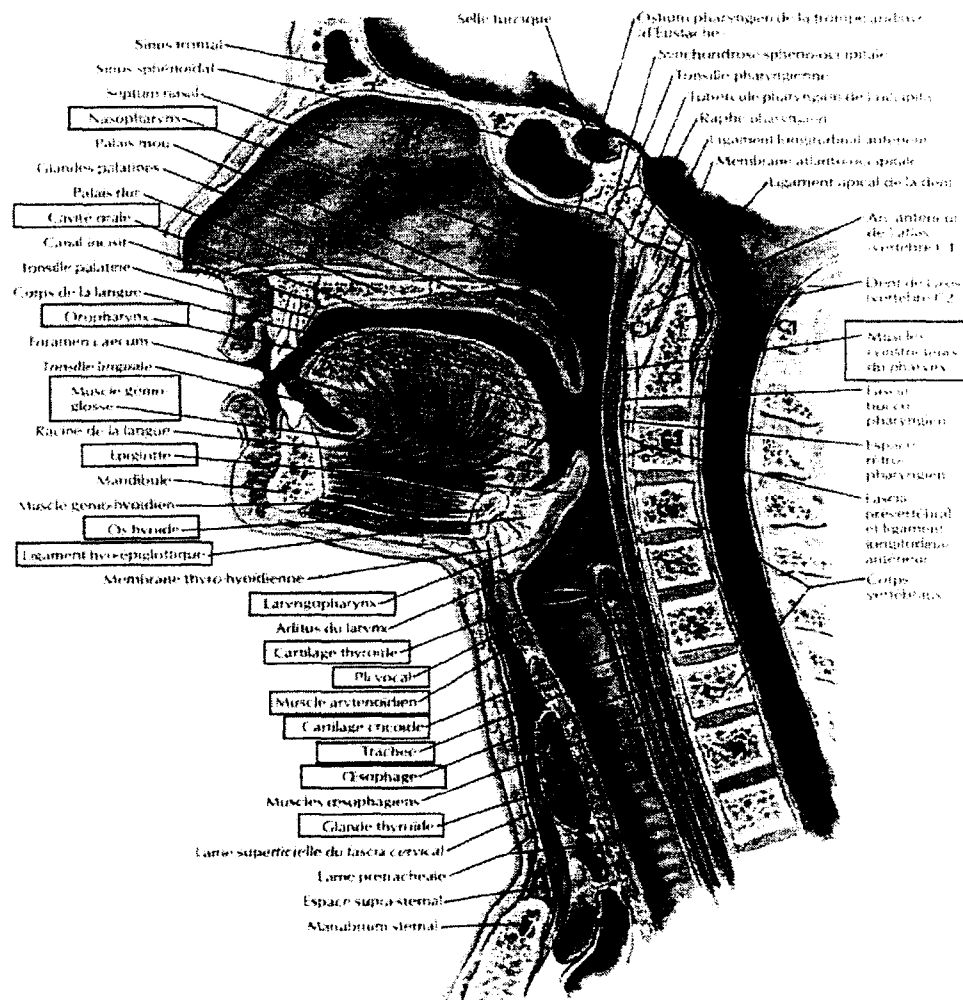


Figure 1 : Schéma récapitulatif des différentes régions du carrefour aérodigestif incluant la cavité buccale, le pharynx, le larynx, la trachée et l'œsophage. Adapté de l'atlas d'anatomie humaine de F.H.Netter, 4<sup>ème</sup> édition.

## 2) Les cartilages pairs :

Les **cartilages aryténoïdiens** sont les plus importants. De forme pyramidale, la base inférieure s'articule avec la partie supérieure de la lame du cartilage cricoïde alors que son sommet s'articule avec le cartilage corniculé. Sur la face antérolatérale se trouvent les insertions des muscles vocaux et du ligament vestibulaire. Au niveau de l'angle latéral de la base se trouve l'insertion des muscles cricoaryténoïdiens postérieurs et latéraux.

Les **cartilages cunéiformes et corniculés** forment les deux autres cartilages pairs du larynx mais sont sans grande importance pour l'exposé de cette thèse. Ils ne seront pas détaillés ici.

## III. Les ligaments laryngés :

Tous les cartilages laryngés décrits ci-dessus sont liés entre eux par des ligaments. Ainsi, le **ligament thyroïdien** assure la liaison entre le cartilage thyroïde et l'os hyoïde et laisse passer dans sa partie latérale l'artère et le nerf laryngés supérieurs. Le **ligament hyoépiglottique** attache la partie antérieure de l'épiglotte à la face postérieure de l'os hyoïde. Le **ligament cricotrachéal** assure la jonction entre le cartilage cricoïde et le premier anneau trachéal.

Au niveau intrinsèque, deux ligaments ont une grande importance sur le plan fonctionnel. Le premier est le **ligament cricothyroïdien** qui s'insère sur l'arc du cartilage cricoïde pour se terminer par un bord libre sur la face postérieure du cartilage thyroïde. Dans leur portion médiane, chacun des deux ligaments cricothyroïdiens s'épaissit pour former **les vraies cordes vocales**. Le deuxième est connu sous le nom de **membrane quadrangulaire** tendue entre le bord latéral de l'épiglotte et le cartilage aryténoïde ipsilatéral en passant par les cartilages corniculés. Dans ce cas-ci aussi un épaississement médian est observé formant **les fausses cordes vocales** dont le rôle est de parfaire l'étanchéité des voies aériennes inférieures durant la déglutition.

#### IV. Les muscles laryngés :

Les muscles laryngés (figure 2), tous innervés par le nerf vague (Xème nerf crânien), sont impliqués dans la protection des VAI durant la respiration (Drake et al. 2006). Les deux **muscles cricothyroïdiens** s'insèrent sur les faces antérolatérales de l'arc du cartilage cricoïde et se terminent sur le rebord inférieur du cartilage thyroïde. Leur rôle est de mobiliser les articulations cricothyroïdiennes en déplaçant vers l'avant et le bas le cartilage thyroïde pour mettre sous tension les cordes vocales. Il est à noter que seuls ces muscles laryngés sont innervés par la branche laryngée supérieure du X, les autres décrits ci-dessous étant innervés par la branche laryngée récurrente du X. Les deux **muscles cricoaryténoïdiens postérieurs** s'insèrent sur la lame du cartilage cricoïde et se terminent sur leur processus musculaire respectifs au niveau du cartilage aryténoïde homolatéral. Leur fonction est l'abduction des cartilages aryténoïdes assurant ainsi en partie la dilatation de la glotte (segment du larynx, en dessous du vestibule et au-dessus de la cavité épiglottique, qui comprend les deux cordes vocales). Les deux **muscles cricoaryténoïdiens latéraux** s'insèrent sur la partie supérieure de l'arc cricoïde, se terminent sur le cartilage aryténoïde et permettent la constriction de la glotte en rapprochant les cordes vocales de la position médiane. Le **muscle aryténoïdien transverse** et le **muscle aryténoïdien oblique** s'insèrent sur le cartilage aryténoïde, se terminent sur le cartilage aryténoïde controlatéral et sont constricteurs de la glotte. Les **muscles vocaux**, parallèles aux cordes vocales, s'insèrent sur le cartilage aryténoïde, se terminent avec les cordes vocales sur la face postérieure du cartilage thyroïdien et assurent la bonne tension des cordes vocales. Pour finir, les **muscles thyroaryténoïdiens** sont des grandes nappes musculaires à la circonférence du larynx tendues entre les cartilages thyroïdiens et aryténoïdes. Ils jouent un rôle dans la constriction du larynx en amenant en antérieur les cartilages aryténoïdiens et en tirant l'épiglotte vers ces derniers. C'est l'activité de ces muscles qui sera enregistrée durant les expérimentations de cette thèse afin d'objectiver une déglutition.

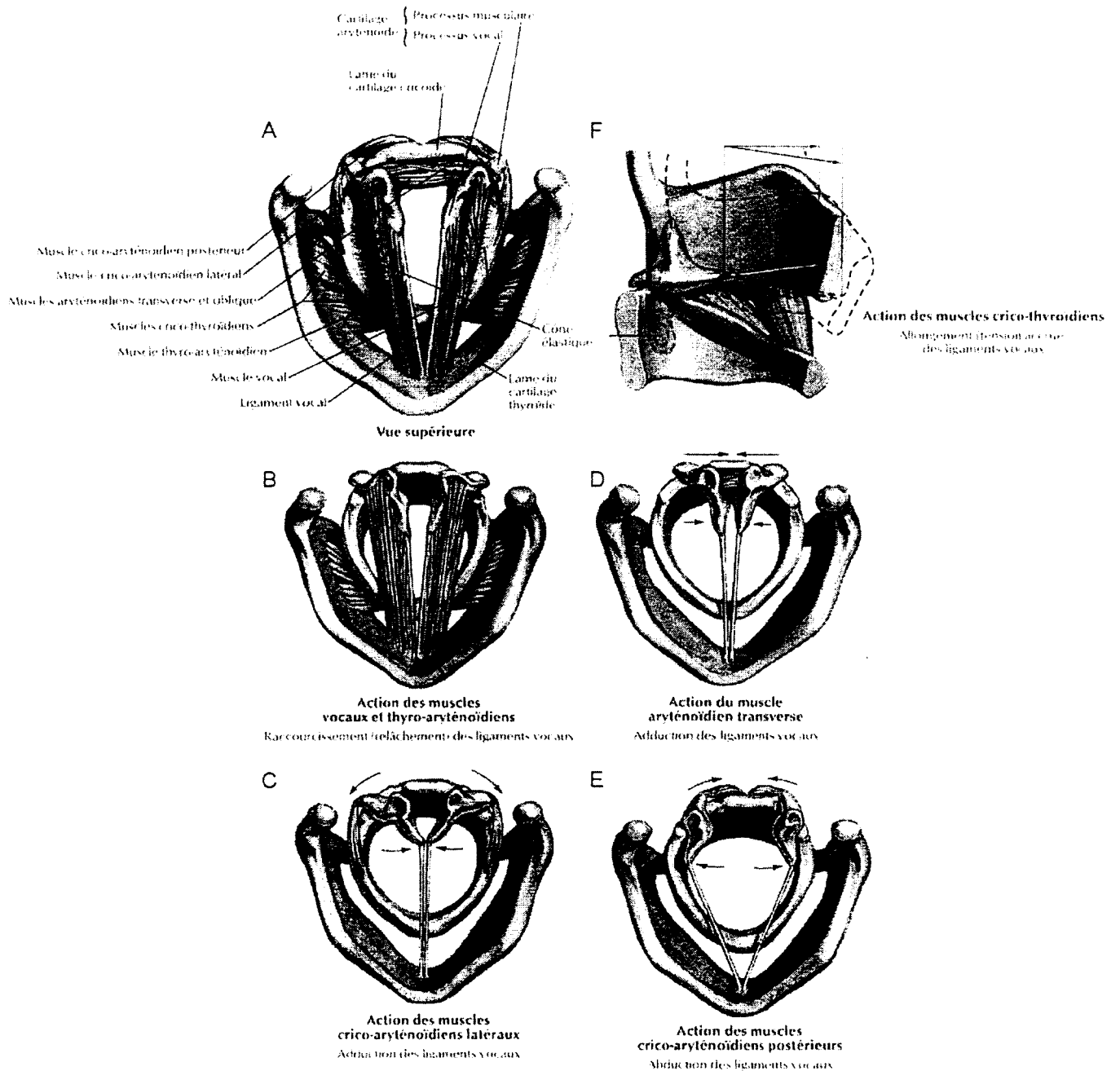
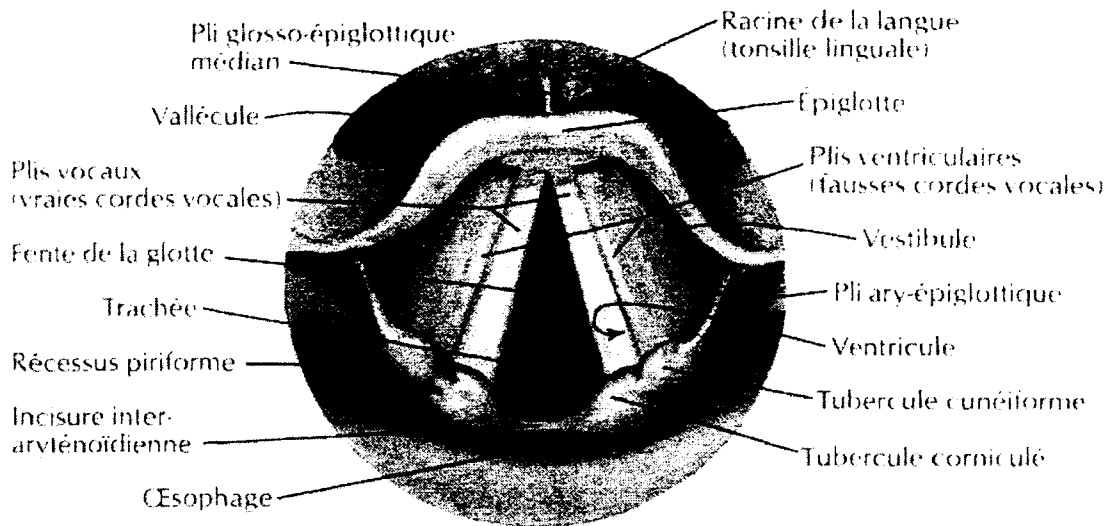


Figure 2: Anatomie de la région du larynx (Netter: atlas d'anatomie humaine). A: anatomie générale. B: muscles thyroaryténoïdiens, constricteurs de la glotte. C: muscles cricoaryténoïdiens latéraux, constricteurs de la glotte. D: muscle aryténoïdien transverse, constricteur de la glotte. E: muscles cricoaryténoïdiens postérieurs, dilatateurs de la glotte. F: muscles cricothyroïdiens, "modulateurs" de l'ouverture de la glotte. Adapté de l'atlas d'anatomie humaine de F.H. Netter, 4<sup>ième</sup> édition.

En céphalique, c'est-à-dire vu par au-dessus, le larynx est une structure anatomique des VAS symétrique (figure 3). On peut décrire en antérieur la base de la langue séparée de la base de l'épiglotte par un espace anatomique appelé **vallécule**. Cette structure anatomique est particulièrement importante en anesthésie, car elle sert d'appui au laryngoscope à lame courbe durant l'intubation endotrachéale. Postérieurement à l'épiglotte, on retrouve l'étage glottique formé par les vraies cordes vocales (épaississement des ligaments cricothyroïdiens) et les fausses cordes vocales (épaississement des membranes quadrangulaires) plus supérieures aux vraies cordes vocales. Lors d'une inspiration, les cordes vocales s'écartent l'une de l'autre en postérieur pour former une ouverture triangulaire à sommet antérieur dans le larynx permettant ainsi le passage de l'air. Un repli anatomique est observé entre la face inférieure des fausses cordes vocales et la face supérieure des vraies cordes vocales constituant le **ventricule laryngé** de chaque côté. L'espace au dessus des vraies cordes vocales appelé étage sus-glottique et constituant le **vestibule laryngé** est délimité par l'épiglotte en antérieur, les replis ary-épiglottiques en latéral, les deux aryténoïdes et la commissure postérieure en arrière. Au-dessus des aryténoïdes, on retrouve les autres cartilages pairs cunéiformes et corniculés. Postérieurement à ces cartilages, se trouve la **bouche œsophagienne**. A l'étage sus-glottique du larynx en postéro latéral, se trouve une structure de l'hypopharynx : **les sinus ou récessifs piriformes** dont le rôle de réservoir à salive et autres sécrétions est essentiel dans la déglutition non nutritive (DNN).



**Larynx normal : inspiration**

Figure 3 : Anatomie du larynx durant l'inspiration en vue céphalique démontrant la position anatomique des structures vestibulaires, ventriculaires et la position des récessus piriformes. La position des cordes vocales en inspiration est aussi illustrée sur cette vue et montre bien la forme triangulaire à sommet antérieur de l'ouverture laryngée. Adapté de l'atlas d'anatomie humaine de F.H. Netter, 4<sup>ème</sup> édition.

### **V. Fonctions du larynx :**

Le larynx joue un rôle majeur dans la respiration, la déglutition. Il intervient aussi dans de multiples autres fonctions comme la parole, la toux, le rire, les hoquets et dans toutes les manœuvres dites d'expulsion incluant l'accouchement, la défécation et la miction (Bartlett, 1989). Cependant, seuls les rôles respiratoires et déglutiteurs seront abordés dans cette thèse.



### 1) Respiration :

Durant la respiration, la glotte prend une forme triangulaire à sommet antérieur via la rotation externe des cartilages aryénoïdes sous l'effet de la contraction des muscles cricoaryénoïdiens postérieurs induisant l'abduction postérieure des cordes vocales. Ainsi, cette ouverture laryngée permet un libre passage de l'air entre les VAI et l'atmosphère durant la respiration.

Chez le nouveau-né, plus particulièrement durant un épisode de détresse respiratoire (infection au virus respiratoire syncytial par exemple), le phénomène de geignement expiratoire (grunting) est observé. Cette réponse physiologique à un état d'oxygénation précaire consiste dans l'adduction des cordes vocales en expiration (occlusion partielle de la glotte) via la contraction des muscles thyroaryénoïdiens, entre autres, dont le but premier est de ralentir la vidange pulmonaire pour maintenir une capacité résiduelle fonctionnelle (CRF) pulmonaire plus élevée. Plus simplement, grâce à cette adaptation respiratoire, le bébé peut garder plus longtemps de l'air oxygéné dans ces poumons et ainsi faciliter l'oxygénation du sang artériel et lutter contre une éventuelle désaturation. Sur le plan clinique le geignement expiratoire est recherché chez le nourrisson pour évaluer la sévérité d'une détresse respiratoire (Prodhan et al. 2010).

Une autre entité peut être observée au niveau de la glotte. Il s'agit du spasme laryngé ou laryngospasme. Physiologiquement, le spasme laryngé se produit lors de la contraction réflexe des muscles constricteurs de la glotte suite à un stress entraînant une adduction partielle ou complète des cordes vocales. Les stress induisant le laryngospasme sont multiples et vont de la simple infection des VAS chez l'enfant jusqu'à la stimulation laryngée par la présence de sang, l'intubation ou encore durant une chirurgie de type ORL. Cliniquement, le spasme laryngé partiel se traduit par la présence d'un stridor inspiratoire associé à un tirage supra-sternal tandis que le spasme complet correspond à un état d'asphyxie sans stridor associé conduisant rapidement à des troubles du rythme cardiaque et une difficulté à ventiler au masque pouvant même aller jusqu'à un arrêt cardio-respiratoire.

## **2) Déglutition :**

La déglutition est considérée comme étant le réflexe majeur de protection des VAI contre l'aspiration des aliments ingérés et/ou régurgités et contre les matières sécrétées (Altschuler, 2001). Durant la déglutition, le larynx est activement fermé par la contraction des muscles mylohyoïdiens, géniohyoïdiens (supra-hyoïdiens) et thyroïdiens tirant l'os hyoïde et le larynx en position antéro-céphalique sous la base de la langue alors que l'épiglotte bascule en postérieur pour dévier le contenu de la déglutition en postérieur vers l'œsophage.

## **VI. Différences anatomiques entre les adultes et les nouveau-nés :**

La fonction de déglutition est la première activité motrice opérationnelle mature de la région pharyngo-laryngée. En effet, dès la onzième semaine de gestation chez l'humain, des déglutitions sont observées (Hooker, 1954 ; Humphrey, 1964). Chez l'agneau en période fœtale, des épisodes de déglutitions en bouffée d'une durée de une à neuf minutes environ sont observées deux à sept fois par jour (Mistretta et Bradley, 1975), permettant de déglutir de 20 à 200 ml de liquide amniotique quotidiennement (Bradley et Mistretta, 1973 ; 1975). Fait intéressant, la quantité de volume amniotique déglutie quotidiennement dans la dernière semaine de gestation correspond à quelques millilitres près au volume de lait consommé quotidiennement dans les premiers jours de vie (Pritchard, 1965). Cependant, la déglutition ne semble pas intervenir dans le contrôle du volume et de la composition ionique du liquide amniotique chez l'ovine, le singe et l'humain (Minei et Suzuki, 1976, Wintour et al. 1978, Peleg et Goldmann, 1978).

Au niveau anatomique (tableau 1), les différences entre les voies aériennes supérieures du nouveau-né et de l'adulte sont nombreuses, ce qui entraîne des répercussions sur la déglutition. En effet, un nouveau-né n'a aucune dent, possède un palais mou assez rigide qui occupe une grande partie du pharynx (Miller, 1982), un larynx en position haute de forme conique avec une partie étroite au niveau des cordes vocales (Litman et al. 2003) ou

de forme cylindrique avec un rétrécissement au niveau cricoïdien (Dalal et al. 2009) et une trachée conique (Wailoo et Emery 1982). Les adultes, quant à eux, possèdent des dents, un palais mou souple et très mobile et une région pharyngo-laryngo-trachéale cylindrique et élargie acquise par la croissance du squelette de la face et du maxillaire inférieur. Ainsi, l'absence de dents diminue l'étanchéité de la cavité buccale et oblige le nouveau-né à utiliser sa langue pour pousser vers l'arrière et à surutiliser ses muscles labiaux et buccinateurs lors de la déglutition de liquide. Chez le jeune enfant, ces adaptations de la déglutition peuvent aussi être observées lors de la perte des incisives. Ces adaptations disparaissent de nouveau lors de l'éruption des dents secondaires. La position haute du larynx, quant à elle, permet une bonne séparation des VAS incluant les fosses nasales, le pharynx et le larynx d'avec les voies digestives incluant la bouche et l'œsophage. Ainsi, une ventilation nasale très efficace chez le nouveau-né est rendue possible y compris pendant l'allaitement (Miller, 1982). Un point anatomique important réside aussi dans la position de l'épiglotte qui descend avec la maturation et s'éloigne du palais mou, permettant une respiration à la fois buccale et nasale en grandissant. La maturation du système nerveux central permet de développer le contrôle volontaire de la phase buccale de la déglutition. Parallèlement, des modifications anatomiques se produisent: l'éruption des dents, l'agrandissement de la taille de la cavité buccale et du pharynx permettent de diversifier les aliments. La déglutition se "posteriorise" avec une absence de contraction des muscles péri-buccaux et la participation plus importante des muscles rétracteurs et éleveurs de la langue (muscles styloglosses et palatoglosses) dans la propulsion du bol alimentaire de la cavité buccale vers le pharynx. La contraction des muscles masticateurs permet par la suite l'apparition d'une déglutition avec les arcades dentaires au contact l'une de l'autre.

	Nouveau-né	Adulte
Système nerveux central	Immature pour le contrôle de la phase volontaire de la déglutition	Mature
Dents	Absence	Présence
Cavité buccale	Étroite	Élargie
Épiglotte	Position plus céphalique	Position plus caudale
Palais	Rigide peu mobile Occupe grande partie pharynx	Souple mobile Plus petit
Larynx	Conique à base céphalique Position plus céphalique	Cylindrique Position plus caudale

Tableau 1 : Différences anatomiques des voies aériennes supérieures entre l'adulte et le nouveau-né humain.

## Chapitre 2 : Physiologie de la déglutition

L'acte de déglutition se divise en 2 grandes catégories selon leur fonction physiologique spécifique. En effet, on distingue clairement les déglutitions dites nutritives (DN) servant à propulser le bol alimentaire de la bouche vers l'estomac des déglutitions non-nutritives (DNN) spécialisées dans la clairance des VAS en dehors des phases de nutrition. Les DNN ont en charge l'élimination digestive des sécrétions des VAS comprenant la salive, la rhinorrhée postérieure et tout reflux laryngopharyngé solide ou liquide afin de protéger les poumons contre toute intrusion sous-glottique de liquide et/ou de solide.

### I. Généralités :

La déglutition est une fonction neuromusculaire complexe impliquant des structures de la cavité buccale, du pharynx, du larynx et de l'œsophage pour permettre le passage des aliments et de la salive depuis la cavité buccale vers l'estomac, en plus d'être le réflexe majeur de protection des VAI (Altshuler, 2001). L'acte de déglutition est subdivisé en quatre grandes phases (Ardran et Kemp, 1951; Bosma, 1957). La phase orale préparatoire et la phase orale proprement dite sont sous le contrôle de la volonté tandis que les phases pharyngée et œsophagienne sont involontaires et réflexes.

#### 1) Les phases volontaires :

La **phase orale préparatoire** est spécifique des DN. Elle est de durée variable et a pour rôle de préparer le bol alimentaire à la déglutition par la mastication (broyage des aliments) en le mélangeant avec la salive. Cette phase inclut la fermeture des lèvres et la contraction des muscles de la bouche pour fermer les commissures labiales, la mastication via les muscles masséters et temporaux, le mouvement de la langue vers l'avant pour amener les

aliments vers les dents et la mobilisation du palais mou vers l'avant pour ouvrir le nasopharynx et faciliter la respiration nasale durant la mastication (Logemann et al. 1998).

La **phase orale** est rapide (1 à 1,5 secondes) et sous le contrôle complet de la volonté. Elle suit immédiatement la phase orale préparatoire pour les DN et consiste en la propulsion du bol alimentaire de la cavité buccale vers le pharynx par la langue où la phase pharyngée est initiée. La contraction de la langue est le point mécanique central de cette phase. Sa contraction permet de lever et propulser vers l'arrière le bolus alimentaire le long du palais dur (Hrycshyn et Basmajian, 1972 ; Kahrilas et al. 1993). Quand le bolus alimentaire passe la région des piliers pharyngés, la phase réflexe pharyngée est enclenchée.

## 2) Les phases involontaires réflexes :

La **phase pharyngée** est la phase la plus rapide (20 cm/sec), la plus courte (0,6 à 1 seconde) et la plus importante de la déglutition, car son rôle est non seulement de faire passer le bol alimentaire dans les voies digestives mais aussi d'assurer la protection des VAI (Doty, 1951 ; Goyal, 1981 ; Goyal et Paterson, 1989). Sur le plan musculaire, cette phase se décompose en cinq parties. La première est la fermeture du nasopharynx par le mouvement du palais mou en postéro-céphalique permettant d'isoler l'oropharynx et le nasopharynx et éviter le reflux nasal d'aliments. La deuxième consiste dans la contraction de la base de la langue pour laisser passer le bolus dans le pharynx. La troisième est la contraction du pharynx lui-même pour faire descendre le bolus et éliminer tous les résidus pouvant s'y trouver. La quatrième est très importante et a pour rôle de protéger les VAI de toute aspiration. Cette partie consiste dans l'élévation et la fermeture du larynx. Finalement, la cinquième partie consiste dans l'ouverture du sphincter supérieur de l'œsophage (SSO) par relâchement du muscle **cricopharyngien**.

Il a été mentionné précédemment que la partie 4 consistait dans l'élévation et la fermeture du larynx. Plus précisément, l'élévation est créée par la contraction des muscles constricteurs pharyngés qui déplace le larynx vers le haut et l'avant, juste sous la langue, pour placer l'ouverture de l'œsophage dans l'axe. La fermeture du larynx implique l'abaissement de l'épiglotte et la contraction des muscles constricteurs de la glotte

**thyroaryténoïdiens et vocaux** (cordes vocales), **cricoaryténoïdiens latéraux** et **aryténoïdien transverse** afin d'empêcher l'accès à la trachée de façon étanche. La contraction de ces muscles entraîne la mobilisation des replis aryépiglotiques et des fausses cordes vocales, renforçant la fermeture. De plus, la contraction des muscles constricteurs du pharynx augmente la pression intraluminaire au niveau pharyngé, ce qui fait avancer le bol alimentaire. La contraction du muscle **cricopharyngien au niveau** du SSO joue aussi un rôle important entre les déglutitions en rendant étanche les voies digestives et limitant les reflux laryngopharyngés. La phase pharyngée a donc en charge la protection des VAI et le nettoyage des VAS de toute nourriture/salive/secrétions nasales depuis les sinus piriformes jusqu'au SSO en passant par les parois du pharynx. Il est à noter qu'une pause respiratoire de 60 à 100 millisecondes est associée à cette phase chez l'adulte. De façon assez intéressante, cette pause est d'environ 790 ms chez le nouveau-né à terme et chez le nourrisson âgé de un an (Kelly et al. 2006).

La **phase œsophagienne** commence après le passage des aliments et/ou salive et/ou reflux gastrique au niveau du SSO. Cette phase est de durée très variable variant de 8 à 20 secondes avec une cinétique très lente (2-4 cm/sec). L'activité musculaire principale de cette phase réside dans le péristaltisme œsophagien assuré dans le tiers supérieur par des fibres musculaires striées squelettiques volontaires et dans les deux tiers inférieurs par des fibres musculaires lisses involontaires. Le péristaltisme œsophagien précède le relâchement du sphincter inférieur de l'œsophage (SIO) qui permet le passage du bolus alimentaire dans l'estomac.

## **II. Le contrôle nerveux de la déglutition :**

L'activité motrice (efférences) est sous la dépendance de centres nerveux responsables de coordonner la contraction des différents muscles, centres eux-mêmes modulés par les informations sensibles périphériques et centrales (afférences).

### **1) Les afférences sensibles de la déglutition :**

Les afférences sensibles impliquées dans la modulation de l'activité de la déglutition renseignent les centres sur l'état physiologique des VAS (bouche, langue, pharynx, larynx), sur la présence d'aliments ou non, sur le niveau de remplissage des sinus piriformes. L'ensemble de ces informations est acheminé vers les centres via certaines paires de nerfs crâniens, tel que décrit ci-dessous (Doty, 1968 ; Miller, 1982 ; Jean, 2001). La première paire impliquée est la branche maxillaire du nerf trijumeau ( $V_2$ ), qui entre dans le crâne par le foramen rond (os sphénoïde) et se termine dans la partie ventrolatérale du pont du tronc cérébral. Elle est entre autre responsable de la sensibilité du tiers moyen de la face (toucher, douleur, température), mais aussi de la sensibilité des deux tiers antérieurs de la langue, des sinus et des méninges. La deuxième paire crânienne impliquée est le nerf glossopharyngien (IX), qui entre dans le crâne par le foramen jugulaire (à la jonction des os temporal et occipital) et se termine à la jonction ponto-bulbaire latérale du tronc cérébral. Elle prend en charge la sensibilité et le goût au niveau du tiers postérieur de la langue ainsi que la sensibilité du pharynx. La troisième et dernière paire impliquée est le nerf vague (X), qui entre dans le crâne par le foramen jugulaire (à la jonction de l'os temporal et occipital) et se termine dans la portion ventrolatérale du bulbe. Elle exerce un rôle sensitif (par sa branche sensitive du nerf laryngé supérieur) au niveau de l'épiglotte, du pharynx et des sinus piriformes. Toute stimulation de l'une de ces terminaisons nerveuses déclenche des messages sensitifs afférents qui informent le système nerveux central de la présence de substances à déglutir (Doty, 1968 ; Dubner et al. 1978). Dans le cas particulier des DNN, un stimulus spécial permet de déclencher directement la déglutition en phase pharyngée. Il s'agit du remplissage des sinus piriformes qui sont des structures concaves situées de part et d'autre des cartilages aryénoïdes dont le rôle est de



recupérer la salive produite (figure 3). Lorsque la quantité de salive atteint un certain niveau dans les sinus piriformes, le nerf laryngé supérieur est stimulé et déclenche la déglutition. Ce nerf, issu du vague, peut à lui seul déclencher la déglutition (Miller, 1972 ; Jean, 2001).

En plus de ces afférences sensitives périphériques, il existe des afférences sensitives centrales activées par des stimuli olfactifs ou visuels. Ces afférences convergent vers le noyau du tractus solitaire (NTS) et les interneurons oropharyngés que l'on détaillera dans la section "Les centres de la déglutition" (Kuypers, 1958). Certaines émanent directement du cortex (Hamdy et al. 1996 ; Martin et Sessle, 1993), d'autres ne sont que le relais des afférences périphériques détaillées ci-dessus (Jean et al. 1975). En effet, les afférences périphériques peuvent gagner le cortex en passant par la protubérance annulaire du tronc cérébral avant de rejoindre le NTS formant une boucle ponto-cortico-médullaire. Ce genre de boucle concerne surtout les afférences oropharyngées et non les afférences œsophagiennes (Jean et Car, 1979 ; Jean, 2001).

## **2) Les centres de la déglutition :**

La localisation des centres de la déglutition a fait l'objet de nombreuses études utilisant des techniques aussi variées que l'enregistrement de l'activité nerveuse par microélectrode, la stimulation nerveuse directe, les lésions sélectives du bulbe rachidien, les microinjections de neurotransmetteurs, de traceurs, etc... Grâce à ces études très variées sur plusieurs modèles animaux (mouton, rat, chat), les centres de la déglutition ont pu être localisés dans le bulbe rachidien. Cependant, le terme de centre de la déglutition fait référence à deux amas d'interneurones (figure 4). Le premier est situé dans la partie dorso-médiane du bulbe rachidien dans le NTS et constitue le groupe dorsal de la déglutition (GDD). Le deuxième, situé dans la partie ventrolatérale du bulbe, juste à côté du noyau ambigu, forme le groupe ventral de la déglutition (GVD). Les interneurons constituant ces deux groupes sont eux-mêmes divisés en deux sous-types de neurones (Jean, 2001) suivant qu'ils contrôlent les motoneurons responsables de l'activation des muscles des phases orale et pharyngée (interneurones oropharyngés) ou de la phase œsophagienne (interneurones œsophagiens).

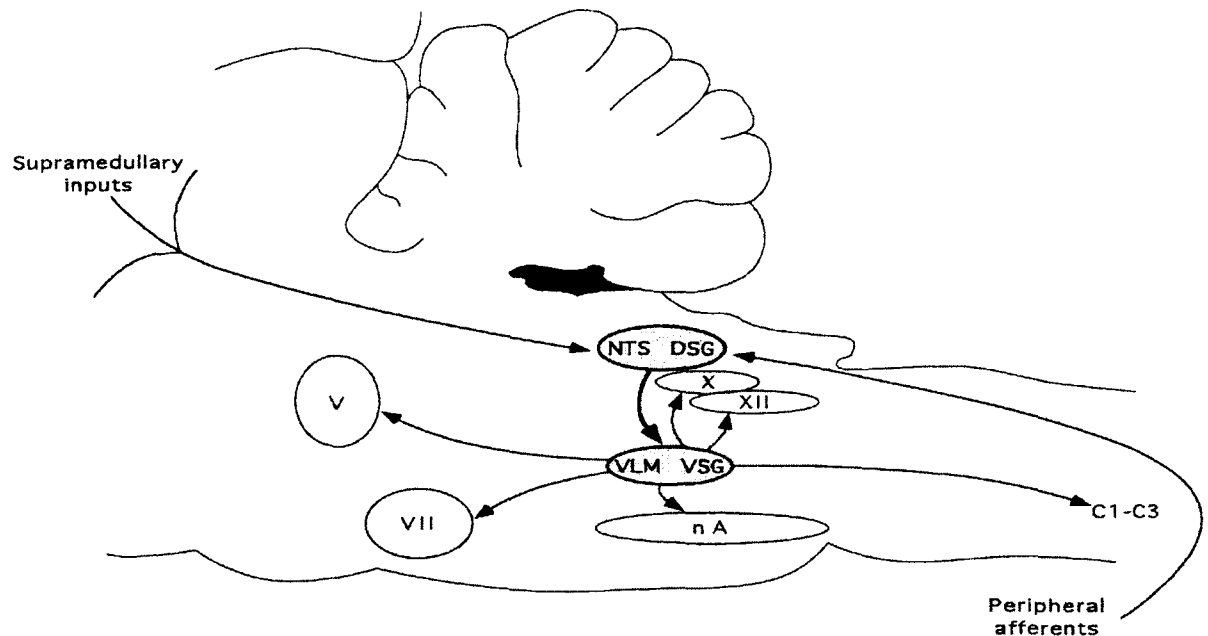


Figure 4 : Organisation du centre de la déglutition chez le rat. Ce "centre" est constitué de deux groupes d'interneurones bulbaire formant le groupe dorsal de la déglutition (GDD ou DSG) situé dans le NTS (noyau du tractus solitaire) et le groupe ventral de la déglutition (GVD ou VSG) localisé dans la région ventrolatérale (VLM) adjacente au noyau ambigu (nA). Le GDD reçoit les afférences en provenance de la périphérie et/ou du cortex cérébral supra-médullaire et est responsable de l'élaboration du programme de déglutition et du déclenchement de l'acte. Le GVD, activé par le GDD, distribue le programme de déglutition aux différents groupes de motoneurones via les nerfs crâniens V (trijumeau), VII (facial), IX (glossopharyngien), X (vague), XII (hypoglosse) ainsi que les nerfs cervicaux C1-C3 (Jean, 2001).

#### a) Le groupe dorsal de la déglutition (GDD): Le NTS.

Le GDD se situe dans la partie caudale du NTS, lui-même situé dans le complexe dorsal du vague. Son rôle est de recevoir et d'intégrer les informations provenant des paires crâniennes V, IX et X innervant les VAS et du cortex cérébral. Il contient les neurones générateurs de la déglutition impliqués dans la programmation et dans le déclenchement la déglutition. Plus précisément, le GDD contient des interneurones oropharyngés impliqués

dans l'initiation de la déglutition (Ciampini et Jean, 1980). Ces neurones n'étant pas activés par les afférences périphériques chez les animaux paralysés, ceci laisse supposer qu'ils ont un rôle "pacemaker" d'origine centrale générateur de la déglutition (Kessler et Jean, 1985 ; Saito et al. 2002). Cependant, la localisation de ces interneurones dans la partie interstitielle du NTS (Barraco et al. 1992) recoupe celle des afférences laryngées et pharyngées, laissant croire qu'il existe *in vivo* une modulation de l'activité génératrice centrale de la déglutition par les afférences sensibles des VAS (Altschuler et al. 1989 ; Mrini et Jean, 1995).

À l'instar des interneurones oropharyngés, le NTS contient aussi des interneurones œsophagiens, mais dans sa subdivision centrale (Altschuler et al. 1989 ; Lu et Bieger, 1998) qui se trouve aussi être une partie du NTS recevant les afférences sensibles œsophagiennes (Doty, 1968).

La communication entre les interneurones oropharyngés et œsophagiens au niveau du NTS implique l'existence de connections nerveuses GABAergiques et cholinergiques qui assurent le couplage de ces deux phases pour initier un acte moteur complet de déglutition (Broussard et al. 1996 ; Zhang et al. 1993 ; Lu et al. 1997 ; Car et al. 2002).

#### **b) Le groupe ventral de la déglutition (GVD) :**

Le GVD situé à proximité du noyau ambigu a un rôle de "chef d'orchestre" et distribue le programme de déglutition élaboré par le GDD aux différents motoneurones assurant la contraction des muscles impliqués dans la déglutition. La présence des interneurones oropharyngés a été démontrée par immunohistochimie en utilisant un marqueur d'activité neuronale (*c-fos*) dans le GVD impliquant par le fait même son rôle dans la mise en place de la phase oropharyngée (Sang et Goyal, 2001 ; Lang et al. 2004). Cependant, la présence d'interneurones œsophagiens reste encore controversée. De plus, les premières études de lésions spécifiques montrent que le GVD et le GDD sont intimement liés. En effet, la destruction spécifique du GDD abolit l'activité du GVD (Jean et Car, 1979 ; Jean, 1990), et des connections anatomiques *via* des interneurones ont été démontrées (Morest, 1967 ; Ross et al. 1985). De plus, le GVD communique aussi avec le GVD controlatéral et avec

les noyaux moteurs des nerfs crâniens V, VII, IX, X (noyau moteur dorsal du X) et XII (Holstege et al. 1977 ; Jean et al. 1983 ; Travers et Norgren, 1983 ; Li et al. 1993 ; Cunningham et Sawchenko, 2000).

### 3) Les efférences:

Une fois le programme de déglutition établi (GDD) et réparti (GVD), des motoneurones appelés neurones préganglionnaires innervent les 31 paires de muscles impliqués dans la déglutition chez l'homme, comprenant les muscles striés squelettiques des VAS et les muscles lisses des deux tiers inférieurs de l'œsophage. Ces motoneurones sont localisés dans les noyaux moteurs de certaines paires crâniennes (nerfs V, VII, XII), dans le noyau ambigu (nerfs IX et X), dans le noyau moteur dorsal du vague (NMDX) et au niveau spinal cervical entre C1 et C3 (Jean, 2001 ; Miller, 1982).

Concrètement, la phase orale préparatoire implique les branches motrices de la paire crânienne V qui innervent les muscles temporaux et masséters impliqués dans la mastication. Elle implique aussi les branches motrices de la paire crânienne VII responsables de la sécrétion salivaire à partir des glandes sous-maxillaires et sublinguales, mais aussi de la contraction des muscles de la face et des lèvres pour assurer la fermeture étanche la cavité buccale. Les branches motrices de la paire crânienne IX sont, quant à elles, impliquées dans la sécrétion de salive à partir des glandes parotides. Enfin, le nerf hypoglosse (XII) purement moteur sert au mouvement de la langue en avant. La phase oropharyngée (association des phases orale et pharyngée) implique non seulement le nerf hypoglosse pour propulser le bolus vers l'arrière grâce à la contraction de la langue, mais aussi les nerfs IX et X responsables à la fois de la fermeture des voies nasales (contraction du palais mou), de la contraction des muscles constricteurs du pharynx et du larynx et de l'ouverture du SSO. La phase œsophagienne, quant à elle, est sous le contrôle du NMDX. Au niveau anatomique, ce noyau se divise en deux parties. La première, rostrale, stimule les fibres musculaires lisses de l'œsophage qui assurent le péristaltisme des deux tiers inférieurs et ouvrent le SIO, contrairement à la partie caudale du NMDX qui inhibe la contraction des muscles lisses et ferme le SIO (Rossiter et al. 1990 ; Collman et al. 1993).

Il est à noter qu'il existe aussi des muscles facultatifs de la déglutition comprenant les muscles extrinsèques de la langue et des lèvres ainsi que les muscles élévateurs du maxillaire inférieur. Ces muscles peuvent ou non participer à la déglutition selon les espèces et/ou les circonstances de la déglutition.

Cependant, pour assurer un acte aussi complexe que la déglutition, la contraction de tous ces muscles impliqués doit être étroitement régulée dans le temps (figure 5). Il a ainsi été démontré que les muscles les plus rostraux se contractent en premier, alors que les plus caudaux se contractent en dernier, assurant par le fait même une bonne propulsion du bolus alimentaire des lèvres jusqu'à l'estomac. De plus, des études électrophysiologiques complémentaires ont montré que les motoneurones impliqués sont non seulement dépolarisés durant la déglutition, mais aussi hyperpolarisés, démontrant l'existence d'influx inhibiteurs d'origine centrale (Jean, 2001) permettant cette parfaite coordination temporelle de la contraction des muscles entre eux (figure 6). Ces influx inhibiteurs s'inscrivent dans le principe d'inhibition réciproque par lequel les motoneurones inhibent tous les motoneurones qui leur sont plus caudaux. Ainsi, plus concrètement, la phase oropharyngée commence dans la plupart des espèces par la contraction du muscle mylohyoïdien (Doty et Bosma, 1956 ; Doty et al. 1967). Le motoneurone activant ce muscle inhibe tous les motoneurones des muscles qui lui sont plus rostraux comme le muscle digastrique antérieur, puis ptérygoïdien interne, puis géniohyoïdien, puis stylohyoïdien, puis styloglosse, puis constricteur supérieur du pharynx, puis palatoglosse et enfin palatopharyngien. Après la contraction de ce muscle, le retour au potentiel de repos du motoneurone contrôlant le muscle mylohyoïdien lève l'inhibition du motoneurone contrôlant le muscle digastrique antérieur qui lui est immédiatement caudal, qui à son tour inhibe les motoneurones encore plus caudaux cités ci-dessus. Et ainsi de suite...

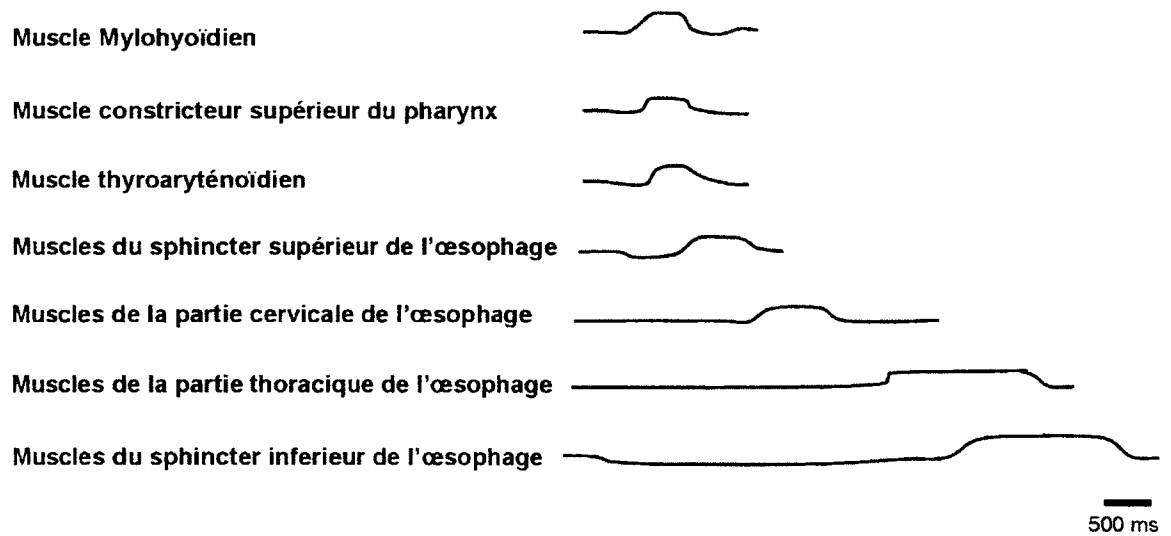


Figure 5 : Schéma illustrant l'activité électrique issue de la contraction de certains muscles impliqués dans la déglutition selon une séquence temporelle très rigoureuse. Les muscles les plus rostraux se contractent en premier, suivi des muscles de plus en plus caudaux (adapté de Jean et al. 2001).

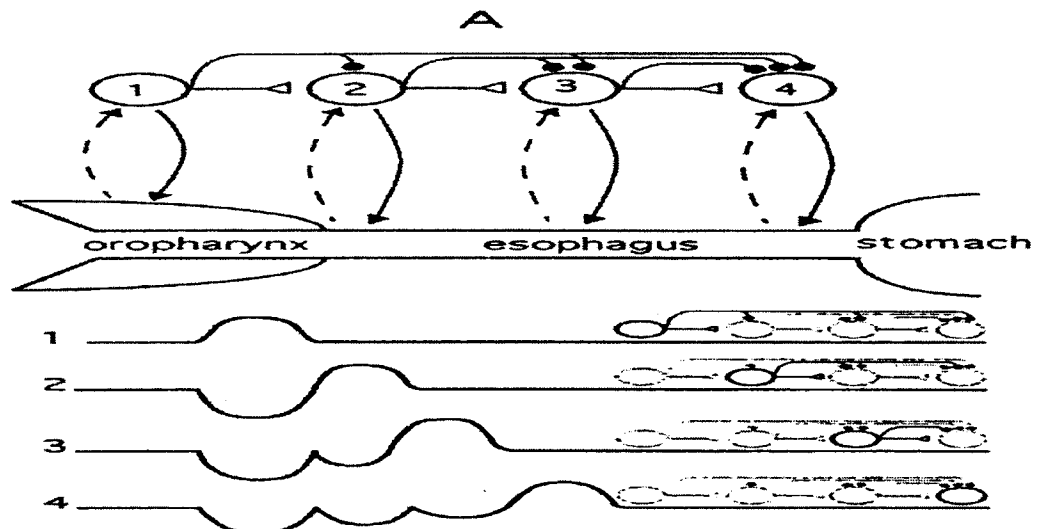


Figure 6: Schéma du principe de l'inhibition réciproque adapté aux motoneurones contrôlant les muscles de la déglutition. Lorsque le motoneurone 1 (le plus rostral) est activé, il inhibe tous les autres motoneurones de la déglutition (plus caudaux). Lorsque le motoneurone 1 est inactivé (retour au potentiel de repos), l'inhibition du motoneurone 2 est levée et il est activé à son tour pour stimuler la contraction du muscle sous son contrôle. Cette activation déclenche l'inhibition des motoneurones qui lui sont plus caudaux : 3, 4 ... et ainsi de suite (Jean et al. 2001).

## Chapitre 3 : Physiologie de la respiration

La fonction respiratoire apporte l'oxygène ( $O_2$ ) nécessaire à l'oxydation du glucose et la production d'énergie sous forme d'ATP. Elle permet aussi d'en éliminer les produits d'oxydation sous forme de dioxyde de carbone ( $CO_2$ ). Ce phénomène à la fois complexe et vital est continu chez les mammifères terrestres et est sous le contrôle d'un « centre » respiratoire situé dans le tronc cérébral qui adapte en permanence la respiration aux besoins métaboliques. Comme de nombreuses fonctions physiologiques, la fonction respiratoire est sous l'activité de muscles dédiés dont l'activité est contrôlée et modulée par de nombreuses afférences périphériques et centrales intégrées dans le bulbe rachidien.

### I. Les muscles respiratoires :

L'acte moteur respiratoire est un événement rythmique mettant en jeu la contraction coordonnée et synchronisée des muscles respiratoires (Monteau et Hilaire, 1991) répartis en deux groupes : les muscles inspiratoires et les muscles expiratoires.

#### 1) Les muscles inspiratoires :

Ils sont composés d'un muscle principal et de muscles accessoires. Leur but est d'assurer une baisse de pression alvéolaire suffisante pour assurer un débit d'air dans les poumons en adéquation avec les besoins métaboliques de l'organisme. Le muscle principal, le **diaphragme**, assure à lui seul plus de 80% du travail inspiratoire. Ce muscle est une large nappe musculo-tendineuse insérée sur les six dernières côtes, la face postérieure de l'extrémité inférieure du sternum et la face antérieure des trois premières vertèbres lombaires. La contraction du diaphragme provoque son abaissement et par conséquent l'augmentation du volume thoracique dans toute sa hauteur. De plus, l'abaissement du diaphragme entraîne une augmentation de la pression abdominale; celle-ci est transmise à

la partie inférieure de la paroi de la cage thoracique par l'intermédiaire de la zone d'apposition du diaphragme et en augmente le diamètre. Enfin, la contraction du diaphragme initie un mouvement en anse de seau des six dernières côtes (passage à l'horizontale) induisant une augmentation de volume dans la partie inférieure du thorax transversalement et dans une moindre mesure en antéropostérieur.

Lors des situations où la demande métabolique est plus grande (stress, effort, ...), des muscles inspiratoires accessoires entrent en jeu et se contractent en synergie avec le diaphragme:

- **Les muscles intercostaux externes** : leur contraction élève les côtes et augmente le diamètre transverse du thorax toujours par le même mouvement en anse de seau des côtes.

- **Les muscles sterno-cléido-mastoïdiens (SCM)** : muscles inspiratoires verticaux de moindre importance insérés entre le sternum, la clavicule et la mastoïde. Ils élèvent la clavicule et déplacent le sternum en avant par un mouvement de « bras de pompe à eau ».

- **Les scalènes** : muscles inspiratoires verticaux de moindre importance, s'insèrent sur les processus transverses des vertèbres C2 à C7 et sur les 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> côtes. Leur contraction élève les 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> côtes.

Evidemment, les muscles contrôlant les VAS sont d'une grande importance en pré-inspiration et en inspiration afin d'éviter que la dépression à l'intérieur des voies aériennes engendrée par la contraction du diaphragme ne "collabe" les VAS au niveau des structures molles comme le pharynx. Au niveau du larynx, qui est une structure cartilagineuse, les muscles laryngés n'interviennent pas pour éviter un collapsus, mais pour diminuer la résistance laryngée, limiter le travail inspiratoire et prévenir la fatigue diaphragmatique.

## 2) Les muscles expiratoires :

Ils ne se contractent pas au repos. En effet, durant cette période, l'élasticité du parenchyme pulmonaire (recul élastique) et le relâchement des muscles inspiratoires permettent à eux



seuls d'augmenter la pression intra-pulmonaire et d'expulser l'air chargé en CO<sub>2</sub>. Durant une expiration forcée, des muscles expiratoires prennent le relais et facilitent l'expulsion de l'air plus rapidement :

- **Les muscles intercostaux internes** : leur contraction abaisse les côtes ce qui diminue le diamètre transverse du thorax.

- **Les muscles abdominaux** : leur contraction augmente la pression intra-abdominale et refoule le diaphragme vers le haut.

- **Les muscles constricteurs de la glotte** : Comme mentionné précédemment dans le chapitre 1 sur le larynx, chez le nouveau-né le phénomène de geignement expiratoire peut-être observé en respiration de repos. Il a pour but de ralentir la vidange pulmonaire via l'adduction des cordes vocales par la contraction des muscles constricteurs de la glotte pour maintenir une CRF plus élevée et faciliter l'oxygénation du sang artériel.

## II. Le contrôle nerveux respiratoire

Le système de contrôle nerveux de la respiration est composé de récepteurs périphériques et centraux dont les informations sont acheminées par des afférences nerveuses et intégrées au niveau des centres respiratoires. Ceux-ci établissent, organisent et commandent le programme de respiration *via* des efférences nerveuses vers les muscles respiratoires.

### 1) Les afférences nerveuses :

Le rôle des récepteurs périphériques et centraux impliqués dans le contrôle de la respiration est d'informer (*via* des messages cheminant par des voies afférentes) les centres respiratoires de l'état de distention des poumons et des pressions des gaz sanguins artériels en temps réel. On distingue ainsi deux boucles de contrôle. La première, qui constitue la boucle "mécanique", prend origine au niveau des mécanorécepteurs disséminés dans les

VAS et l'appareil thoraco-pulmonaire et achemine l'information vers les centres de la respiration via le nerf vague (X). La deuxième, qui constitue la boucle chémoréflexe, a pour origine les chémorécepteurs périphériques et centraux.

#### **a) Afférences respiratoires : la boucle mécanique:**

Les récepteurs des voies aériennes se divisent en 3 grandes catégories suivant leur localisation anatomique.

##### **i/ Les récepteurs broncho-pulmonaires (Bailey et Fregosi, 2006):**

- **Les mécanorécepteurs à adaptation lente** (récepteurs à l'étirement) en étroite relation avec les fibres musculaires lisses de la trachée et des bronches, sensibles à l'étirement des muscles lisses en inspiration et impliqués dans la limitation de l'effort inspiratoire (réflexe de Hering-Breuer).
- **Les mécanorécepteurs à adaptation rapide ou récepteurs à l'irritation**, situés dans et en dessous de l'épithélium bronchique en contact étroit avec les veinules bronchiques. Ils sont sensibles aux stimuli mécaniques et aux agents chimiques irritants, à la poussière (tabac) et autres polluants. Ils induisent une augmentation de la ventilation et des sécrétions et sont impliqués dans les soupirs, la toux et le bronchospasme.
- **Les terminaisons des fibres C broncho-pulmonaires**, avec 2 contingents, un bronchique (au niveau de l'épithélium bronchique) et un pulmonaire (juxta-alvéolaire, d'où l'ancienne dénomination de récepteurs J). Elles sont innervées par des fibres vagues (Sant'Ambrogio, 1982) non myélinisées à 75% (Jammes et al. 1982). Elles sont sensibles à la douleur induite par des polluants ou autres agents irritants (traditionnellement la capsaïcine dérivée du piment fort) et par la congestion vasculaire (effort, œdème). Leur stimulation expérimentale par injection intraveineuse de capsaïcine entraîne le chémoréflexe pulmonaire, constitué d'une apnée centrale, d'une bradycardie et d'une hypotension systémique durant quelques secondes, et suivies d'une tachypnée superficielle pouvant durer quelques minutes. Cette dernière est la seule manifestation rencontrée en conditions

non expérimentales. La stimulation des terminaisons des fibres C, combinée à la stimulation des récepteurs à l'irritation, initie le réflexe de toux pour protéger les VAI contre l'inhalation d'irritants (Lee, 2009).

#### **ii/ Les récepteurs des voies aériennes supérieures :**

Principalement situés dans le larynx, les récepteurs se retrouvent sur toute la longueur des VAS et sont capables de modifier la commande respiratoire centrale en modulant le rythme, la fréquence et l'amplitude respiratoire (Sant'Ambrogio, 1996 ; Widdicombe, 2001 ; Reix et al. 2007).

- **Les mécanorécepteurs au froid**, innervés par des fibres non myélinisées, sont activés dès que la température descend sous 22°C et présentent une activité maximale à 14°C lors de la respiration buccale.
- **Les mécanorécepteurs musculaires**, stimulés par les mouvements laryngés actifs et passifs (dont les mouvements transmis au larynx par les mouvements de la cage thoracique induits par les muscles respiratoires).
- **Les mécanorécepteurs à l'irritation**, localisés en surface de la muqueuse des VAS, sont des fibres myélinisées de petit diamètre (A $\delta$ ) activés par des stimuli mécaniques et chimiques irritants (eau, ammoniac, fumée de cigarette, CO<sub>2</sub>).
- **Les terminaisons des fibres C** non myélinisées, dont le rôle est semblable à celui décrit précédemment au niveau broncho-pulmonaire, sont retrouvées au niveau de la muqueuse laryngée.

#### **iii/ Les récepteurs de la paroi thoracique :**

Il s'agit des récepteurs se trouvant dans les muscles respiratoires et les articulations costo-vertébrales (cage thoracique) qui constituent avec la paroi abdominale ce qui est appelé en mécanique ventilatoire la paroi thoracique. Pour des raisons de simplification, ces récepteurs ne seront pas abordés dans cette thèse.

### **b) Afférences provenant des chémorécepteurs : la boucle chémoréflexe :**

Cette boucle humorale monitore en permanence 1) la pression partielle des gaz du sang artériel au niveau périphérique par des chémorécepteurs artériels principalement sensibles à la pression partielle en oxygène ( $\text{PaO}_2$ ) et en dioxyde de carbone ( $\text{PaCO}_2$ ) ainsi qu'au pH ; 2) la  $\text{PCO}_2$  et le pH au niveau cérébral. Elle participe aussi à l'intégration de ces afférences chimiques au niveau central et modifie la commande centrale du système respiratoire et cardiovasculaire. Ce faisant, elle régule la pression partielle des gaz du sang artériel en  $\text{O}_2$  et  $\text{CO}_2$  vers des valeurs physiologiques, en particulier durant des épisodes d'augmentation du métabolisme (effort).

#### **i/ Au niveau périphérique :**

La détection périphérique des gaz du sang se fait au niveau des corps carotidiens et des corps aortiques, organes paires localisés respectivement au dessus de la bifurcation carotidienne (Heymans et Bouckaert, 1930) et au pourtour de la crosse de l'aorte (Cheng et al. 1997 ; Brophy et al. 1999).

Le corps carotidien est un petit organe d'environ 2 mm de diamètre pour un poids de 23 mg (Nguyen et al. 2011), innervé par le nerf sinusal carotidien, branche du nerf glossopharyngien (NC IX). Il reçoit en permanence un apport sanguin artériel à haut débit venant de l'artère carotide externe. La chémosensibilité aux gaz du sang et au pH artériel des cellules glomiques de type I est rendue possible par un vaste réseau capillaire, faisant du corps carotidien l'organe le plus vascularisé du corps humain (Gonzalez et al. 1994). Les cellules glomiques de type I répondent aux variations de  $\text{PaO}_2$ ,  $\text{PaCO}_2$  et de pH artériel. L'intégration de la chémosensibilité implique des neurotransmetteurs comme l'acétylcholine et l'ATP ainsi que de nombreux neuromodulateurs comme le No et la dopamine.

Les corps aortiques correspondent à des amas de cellules diffus répartis le long de la crosse de l'aorte composés aussi de cellules glomiques de type I. Ils sont innervés par le nerf

aortique, branche du nerf vague (NC X). Cependant, leur importance dans le monitoring des gaz du sang reste minime après la naissance, en comparaison aux corps carotidiens.

Il est à noter que des structures barosensibles appelées sinus carotidiens et aortiques sont voisines des corps carotidiens et aortiques. Leur rôle est la détection de la pression artérielle. Cependant, ils ne seront pas détaillés dans cette thèse.

### **ii/au niveau central :**

Les centres nerveux sont aussi directement sensibles à la composition du sang artériel qui les irrigue comme démontré par Frédéricq en 1890 par une judicieuse expérience de perfusion croisée. Cette étude représentée à la figure 7 montre qu'après anastomose chirurgicale croisée entre les circulations artérielles céphaliques de 2 chiens A et B, l'asphyxie du chien B stimule la respiration du chien A et induit une hypoventilation du chien B, prouvant ainsi l'existence d'une chémosensibilité centrale.

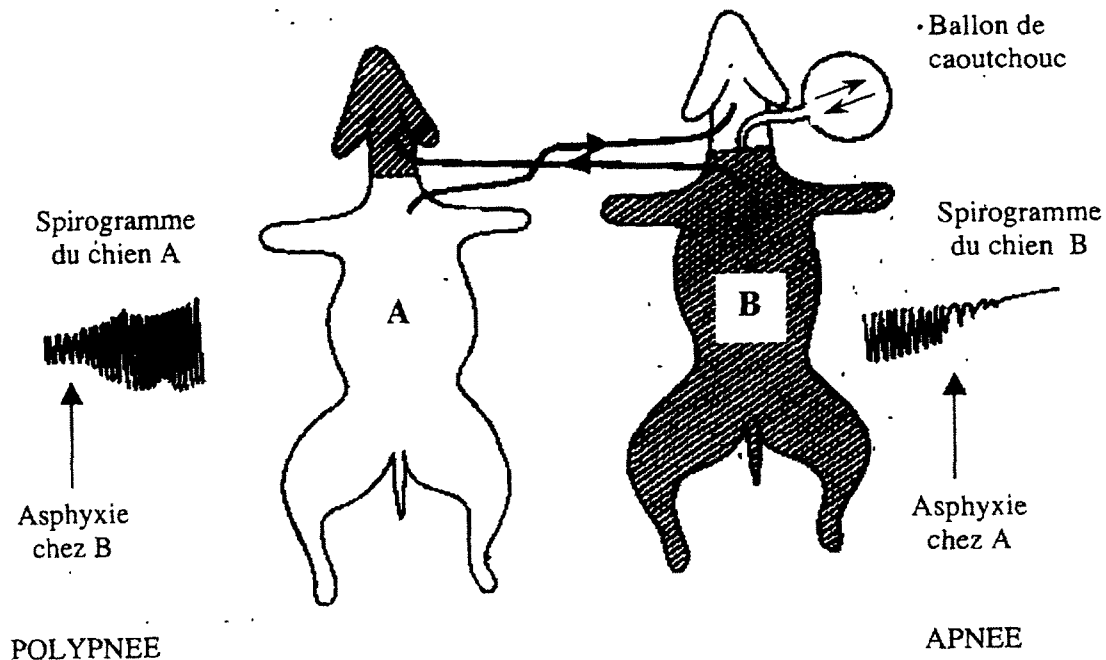


Figure 7 : Représentation schématique de l'expérience des circulations céphaliques croisées chez le chien. Après anastomose entre les circulations céphaliques des chiens A et B, le chien B est asphyxié en le faisant respirer dans un ballon dont l'air n'est pas renouvelé. Le sang du chien B devient hypoxique / hypercapnique / acide. Ce sang issu du chien B, en irrigant le cerveau du chien A, qui respire de l'air normal, induit une hyperventilation en réponse à l'asphyxie du chien B. Parallèlement, le cerveau du chien B est perfusé par un sang hyperoxique / hypocapnique / alcalin induit par l'hyperventilation du chien A, causant chez le chien B une apnée d'origine centrale. Ces résultats démontrent l'existence d'une détection centrale de la teneur du sang en O<sub>2</sub> et/ou en CO<sub>2</sub> et/ou en ion H<sup>+</sup>. Adapté d'après Hermann et Cier, Précis de physiologie, IV<sup>ème</sup> édition, Masson, Paris, 1989.

Des études plus récentes ont démontré que non seulement le CO<sub>2</sub>, mais aussi l'O<sub>2</sub>, pouvaient aussi être directement détectés par des neurones centraux. En effet, le CO<sub>2</sub> est détecté au niveau des structures cérébrales (Coates et al.1993 ; Nattie, 1999), plus précisément au niveau du NTS, des noyaux du raphé et du noyau rétrotrapézoïde (Li et al. 1999 ; Nattie, 1999 ; Nattie, 2001 ; Nattie et Li, 2001 ; Nattie et Li, 2002 ; Taylor et al. 2005 ; Guyenet, 2008). D'autres neurones disséminés dans tout le tronc cérébral sont aussi impliqués (Neubauer et Sunderram, 2004) dans la chémosensibilité au CO<sub>2</sub>. Quant à elle, la preuve de la sensibilité centrale à l'oxygène a été faite au niveau de l'hypothalamus caudal et dans le bulbe ventral (Sun et Reis, 1994 ; Horn et Waldrop, 1997 ; Kawai et al. 1999).

### iii/ Intégration des afférences provenant des chémorécepteurs

Tous ces chémorécepteurs périphériques et centraux sont intégrés dans une boucle réflexe de contrôle respiratoire appelée le chémoréflexe artériel au sens large du terme (dits chemoreflexes artériels périphériques et centraux). D'un point de vue général, le chémoréflexe artériel sert à adapter la respiration (augmentation ou diminution de la ventilation alvéolaire) en fonction de la  $\text{PaO}_2$ , de la  $\text{PaCO}_2$  et de l'acidité du sang artériel. Plus précisément, lors d'une baisse de la  $\text{PaO}_2$  et/ou de l'augmentation de la  $\text{PaCO}_2$  et/ou d'une acidose, les chémorécepteurs carotidiens et dans une moindre mesure les chémorécepteurs aortiques sont stimulés. Cette information est dirigée vers le NTS qui intègre ces afférences nerveuses et en informe les centres respiratoires (voir section ci-dessous sur les centres respiratoires). La stimulation des centres respiratoires engendre une modification de la commande respiratoire et la stimulation des différents motoneurons respiratoires induisant une augmentation de la ventilation alvéolaire dont l'effet net est l'augmentation de la  $\text{PaO}_2$  (valeurs normales : 80-120 mmHg), la diminution de la  $\text{PaCO}_2$  (valeurs normales : 35-45 mmHg) et le rétablissement d'un pH artériel optimal (7,35-7,45).

**Remarque :** Les corps carotidiens sont très sensibles à des variations minimales de la  $\text{PaCO}_2$ . Cependant, globalement, ils ne sont responsables que d'un tiers de l'amplitude de la réponse ventilatoire au  $\text{CO}_2$  (2/3 issus des chémorécepteurs centraux).

## 2) Le centre respiratoire :

La respiration semble être un acte moteur simple permettant d'alterner l'inspiration et l'expiration. Cependant, elle est sous la dépendance centrale de multiples neurones. Ces derniers sont répartis dans différents groupes de contrôle situés en majorité le long de la portion ventrale du bulbe rachidien et dans le pont du tronc cérébral. Leur activité permet le contrôle des nerfs spinaux et rachidiens responsables de l'activité musculaire respiratoire, ainsi que des nerfs crâniens innervant les muscles des VAS impliqués dans la respiration. La respiration normale est constituée de trois phases, toutes sous la dépendance des centres respiratoires. On distingue ainsi l'inspiration, la post-inspiration E1 (expiration) et l'expiration tardive E2 (Ramirez et Richter, 1996).

Actuellement, l'organisation centrale de la respiration se base sur l'existence d'un groupe respiratoire dorsal (GRD) intégrateur des afférences nerveuses et d'une colonne respiratoire ventrale (CRV) responsable de la rythmogénèse de la respiration sous le contrôle direct, en temps réel du GRD. Dans cette conception du contrôle de la respiration, le GRD est constitué du NTS dont le rôle crucial est l'intégration des afférences nerveuses périphériques et centrales décrites ci-dessus combinée aux afférences vagales d'origine bronchopulmonaire et des VAS. Ainsi, le GRD joue un rôle de premier plan comme modulateur direct de la rythmogénèse respiratoire assurée par la CRV. De plus, certaines études sur le GRD notamment chez le chat démontrent l'existence de neurones inspiratoires avec des projections spinales pour la stimulation des motoneurones phréniques, l'implicant dans la rythmogénèse (Hilaire et Duron, 1999). Il est à noter que cette découverte ne fait pas l'unanimité chez la souris et le rat. L'implication du NMDX situé aussi dans la partie dorsale du bulbe résiderait dans le contrôle de la bronchomotricité. Selon la conception actuelle, la rythmogénèse respiratoire proprement dite serait assurée à elle seule par la partie ventrale du bulbe composant la CRV. Ainsi, la CRV (figure 8) serait composée du complexe de Bötzinger (BötC), du complexe de pré-Bötzinger (pré-BötC) et du GRV rostral et caudal (Alheid et McCrimmon, 2008 ; Smith et al. 2009). **Le BötC** contient principalement des neurones expiratoires de type *post-I* et *aug-E*. Les neurones *post-I* ont une activité décroissante durant l'expiration alors que les neurones *aug-E* voient leur activité augmenter en expiration. Par conséquent, le BötC est considéré durant la respiration normale (eupnée) comme étant la source d'activité expiratoire prédominante et jouant aussi un rôle dans la transition entre l'inspiration et l'expiration (Ezure et al. 2003). **Le pré-BötC** est adjacent et caudal au BötC. Il contient des neurones essentiels pour l'activité inspiratoire par ces neurones *pré-I* dont l'activation commence avant même l'inspiration et perdure tout au long de l'inspiration (Feldman et Del Negro, 2006). Une des caractéristiques de cette activité inspiratoire réside dans sa rythmogénèse intrinsèque. Plus précisément, des études *in vitro* ont démontré que le pré-BötC isolé possédait une activité pacemaker intrinsèque dépendante de canaux sodiques, potassiques et calciques (Koshiya et Smith, 1999 ; Johnson et al. 2001 ; Pace et al. 2007 ; Koizumi et Smith, 2008). Ainsi, le pré-BötC possède une activité rythmique inspiratoire et la capacité de mettre fin lui-même à l'inspiration par l'inhibition des neurones *pré-I* par les



neurones inhibiteurs GABAergiques et glycinergiques qui composent ce même complexe (Kuwana et al. 2006 ; Winter et al. 2009). Le **GRV rostral (GRVr)** est immédiatement caudal au pré-BötC et ne possède pas de rythmogénèse intrinsèque (Smith et al. 2007). Ce groupe est composé en majorité de neurones *Ramp-I* dont l'activité augmente graduellement au cours de l'inspiration. Ces neurones projettent vers le nerf phrénique et les motoneurones inspiratoires intercostaux pour moduler l'inspiration (Bianchi et al. 1995 ; Ramirez et Richter, 1996). Le **GRV caudal (GRVc)** est composé de neurones expiratoires dont l'activité augmente au court de l'expiration. Il est le pendant expiratoire du GRVr et reçoit des projections du BötC (Smith et al. 2009).

Ces quatre groupes de la CRV, en plus de communiquer entre eux par des inter-neurones, sont modulés par des influx nerveux en provenance du GRD, du noyau rétrotrapezoïde (RTN), des noyaux du raphé et des circuits neuronaux pontiques. Le **noyau rétrotrapezoïde (RTN)**, rostral au BötC et antérieur au noyau du nerf facial (VII), est sensible à la concentration en CO<sub>2</sub> dans le liquide céphalorachidien et reçoit une partie des informations des chémorécepteurs périphériques à l'O<sub>2</sub> (Mulkey et al. 2004 ; Guyenet et al. 2005). En modulant l'activité des groupes neuronaux composant le CRV, le RTN permet d'adapter la réponse ventilatoire en fonction des besoins métaboliques. Des études *in vitro* chez le rongeur en période néonatale ont démontré l'existence de neurones *pré-I* dans un amas de neurones constituant le **noyau parafacial** (Onimaru et al. 1997 ; Onimaru et Homma, 2006). Ce noyau, colocalisé avec le RTN serait responsable de la première excitation rythmique du pré-BötC. D'autres études suggèrent que le noyau parafacial (pFRG) est un générateur de rythme expiratoire, à l'inverse du pré-BötC qui est inspiratoire, favorisant une meilleure alternance entre inspiration et expiration (Feldman et Del Negro, 2006 ; Janczewski et Feldman 2006). Ainsi, le complexe RTN / pFRG serait impliqué dans la coordination inspiration / expiration dépendamment du métabolisme (Champagnat et al. 2009). Les circuits ou groupes respiratoires pontiques (PRG), quant à eux, se composent du noyau de **Kölliker-Fuse (KF)** et du **complexe parabrachial (LPB)**. Le rôle exact des ces amas de neurones reste encore peu étudié. Cependant, ils auraient un rôle dans la coordination entre les muscles expiratoires et ceux des muscles des VAS en expiration, dans l'intégration du signal sensorimoteur ainsi que dans les transitions de phases entre inspiration et expiration (Potts et al. 2005 ; Dutschmann et Herbert, 2006)

### 3) Les voies efférentes :

Les voies efférentes du système respiratoire se composent des motoneurones responsables de la contraction des muscles impliqués dans la mécanique respiratoire cités précédemment. Ainsi, le diaphragme est innervé par le nerf phrénique (dont l'origine est au niveau des segments médullaires de C3-C5). Les muscles intercostaux sont innervés par les nerfs intercostaux (dont l'origine est au niveau des segments médullaires thoraciques). Les SCM sont innervés par la 11<sup>ème</sup> paire crânienne (nerf spinal). Les scalènes sont innervés par les 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> racines cervicales. Les abdominaux, comprenant le grand droit, le grand et le petit oblique et le transverse de l'abdomen sont innervés par les racines thoraciques de T5-T12.

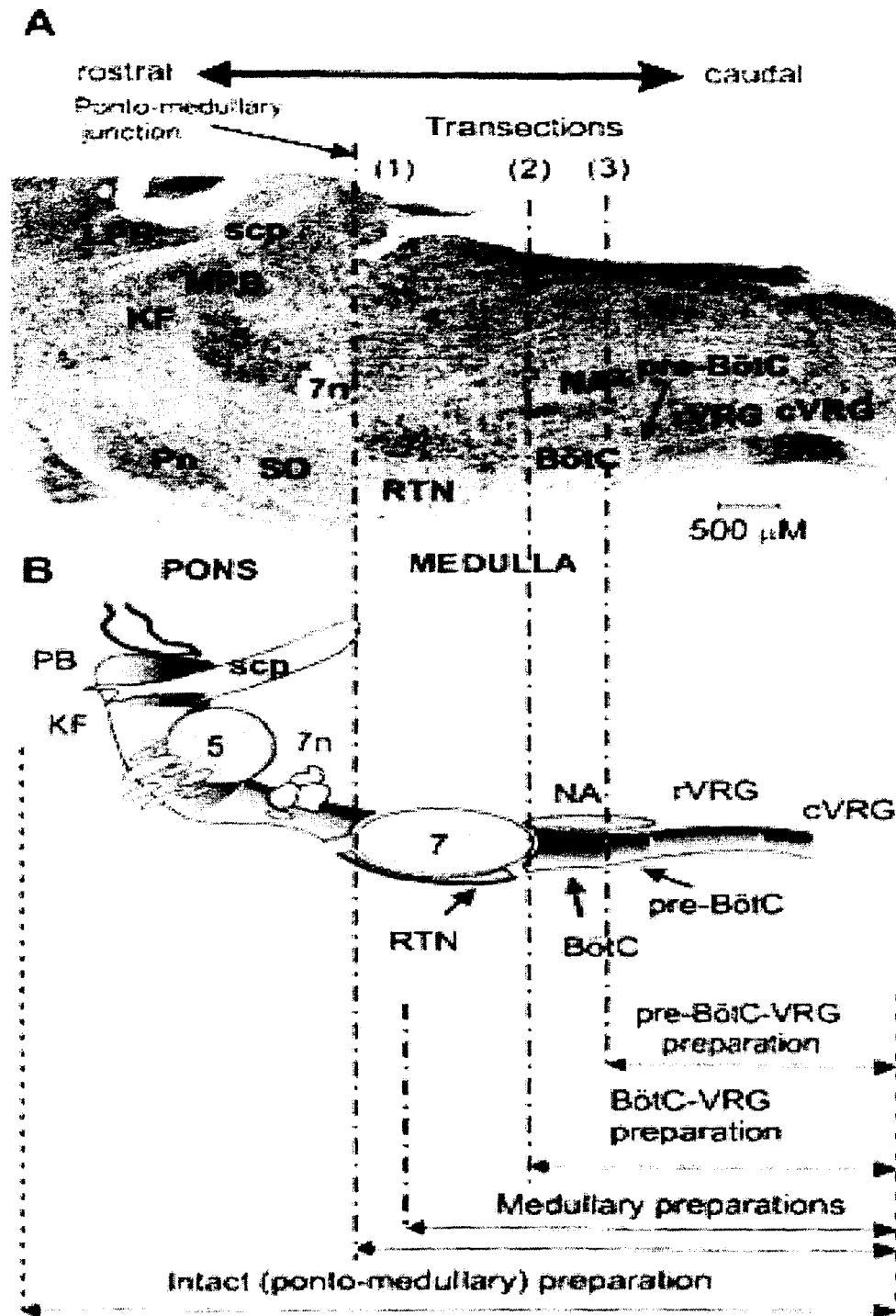


Figure 8 : Organisation neuronale du centre respiratoire (d'après Rybak et al. 2007). Coupe parasagittale d'un cerveau de rat démontrant l'emplacement des centres respiratoires majeurs. cVRG : Groupe respiratoire ventral caudal, rVRG : Groupe respiratoire ventral rostral, Pré-BötC : complexe de pré-Bötzinger, BötC : complexe de Bötzing, RTN : noyau rétrotrapézoïde, KF : noyau de Kölliker-Fuse, PB : noyau Parabrachial, NA : noyau ambigu, 5 : noyau du trijumeau (V), 7 : noyau du nerf facial (VII).

## **Chapitre 4 : Coordination Déglutition-respiration**

### **I. Indices de l'existence de la coordination déglutition-respiration**

La déglutition et la respiration sont deux fonctions physiologiques qui agissent en étroite collaboration. Sur le plan anatomique, ces deux fonctions ont en commun les voies aérodigestives supérieures (voir les 2 premiers chapitres de cette thèse). De plus, les centres nerveux les contrôlant sont voisins au niveau du bulbe rachidien. Plus précisément, le GDD et le GRD partagent des structures nerveuses à proximité du NTS et le GVD et la CRV se partagent la substance réticulée à proximité du noyau ambigu. Sur le plan mécanique, lors d'une déglutition, les VAS ne peuvent servir pour la respiration, ce qui se traduit par une pause respiratoire durant la phase pharyngée de la déglutition quels que soient l'espèce et l'âge (Stevenson et Allaire, 1991 ; McFarland et Lund, 1993 ; Hiss et al. 2003 ; Kelly et al. 2006). Cette pause est induite par une inhibition de la commande respiratoire par les centres de la déglutition. Les déglutitions sont donc systématiquement associées à une courte pause respiratoire, quels que soient l'espèce et l'âge (Stevenson et Allaire, 1991 ; McFarland et Lund, 1993 ; Jean, 2001 ; Hiss et al. 2003 ; Kelly et al. 2006). La coordination entre DNN et respiration doit être parfaite pour éviter les aspirations et les apnées prolongées.

### **II. Importance physiologique de la coordination déglutition-respiration :**

L'être humain adulte produit en dehors des périodes de repas de la salive dont le volume peut aller jusqu'à deux litres par jour. Les DNN (déglutitions non-nutritives survenant en dehors des périodes d'alimentation) sont donc essentielles pour la clairance de cette salive et ainsi éviter un passage dans les VAI. De plus, chez le nouveau-né, il faut ajouter à cette quantité de salive produite le volume de liquide correspondant aux reflux gastro-œsophagiens (RGO). Les RGO fréquents et physiologiques en période néonatale (Jeffery et al. 2000 ; Poets, 2004) sont reliés à au moins trois mécanismes. Le premier réside dans

la position allongée du nouveau-né quasi permanente. Le deuxième, d'ordre anatomique, réside dans le fait que l'estomac à cet âge est très petit en comparaison de la quantité de lait ingéré au cours d'une journée (équivalent d'un adulte buvant 14 litres par jour). Le troisième, d'ordre physiologique, réside dans l'immaturation du SIO notamment chez les enfants prématurés (Poets, 2004). Cependant, la déglutition à elle seule ne suffit pas pour une bonne prévention des aspirations et nécessite une parfaite coordination entre DNN et respiration. La coordination est aussi cruciale pour la prévention des apnées (Nishino et al. 1985). Actuellement, en période néonatale, les problèmes d'ordre respiratoire et digestif restent les deux plus importantes causes d'hospitalisation prolongée, laissant penser que l'altération de l'une de ces fonctions aura un retentissement direct sur l'autre fonction, perturbant la coordination DNN-respiration.

### III. Coordination DNN-respiration.

La revue de la littérature montre que l'étude de la coordination DNN-respiration reste limitée et que les résultats divergent selon l'âge et l'espèce étudiés. Deux classifications complémentaires des DNN émergent de la littérature. La première classification est purement **descriptive** et sépare les DNN en quatre types en fonction de la phase respiratoire qui précède et qui suit la pause respiratoire induite par la déglutition. La deuxième est **quantitative** et rapporte un pourcentage de la phase respiratoire perturbée par la DNN en fonction des temps inspiratoire et expiratoire du cycle contrôle qui précède la DNN.

La classification descriptive retenue par notre laboratoire pour l'étude des DNN en période néonatale (Reix et al. 2003) comporte quatre types de DNN : le **type ii** dont la pause induite par la DNN commence et se termine dans l'inspiration, le **type ee** dont la pause commence et se termine en expiration, le **type ie** dont la pause commence en inspiration et se termine en expiration et le **type ei** dont la pause commence en expiration et se termine en inspiration (figure 9).

La classification quantitative proposée par Charbonneau et al. 2005 évalue plus précisément le niveau de perturbation du cycle respiratoire induit par la présence de la DNN. Techniquement, le temps d'apparition de la DNN dans le cycle respiratoire étudié est exprimé en pourcentage de la durée totale du cycle respiratoire précédent qui sert de contrôle (figure 10). Le cycle respiratoire est donc subdivisé en déciles dont 0% correspond au début de l'inspiration et 100% à la fin de l'expiration du cycle contrôle. Les DNN survenant à un temps plus grand que la durée du cycle contrôle sont classées dans l'intervalle 100% et plus.

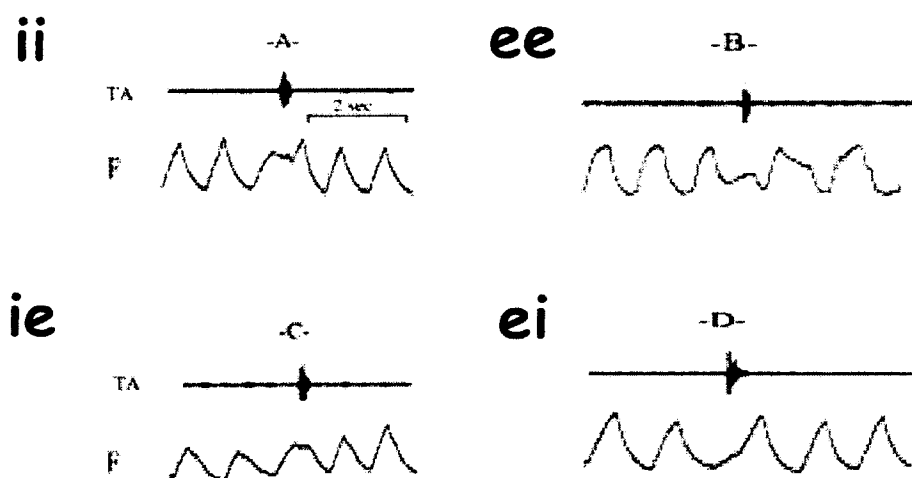


Figure 9 : Classification descriptive des DNN d'après Reix et al. 2003. Le type ii dont la pause induite par la DNN commence et se termine en inspiration, le type ee dont la pause commence et se termine en expiration, le type ie dont la pause commence en inspiration et se termine en expiration et le type ei donc la pause commence en expiration et se termine en inspiration. TA : activité électrique du muscle thyroaryténoïdien (reflet d'une DNN). F : Flux nasal (l'inspiration correspond à l'ascension de la courbe et l'expiration à la descente).

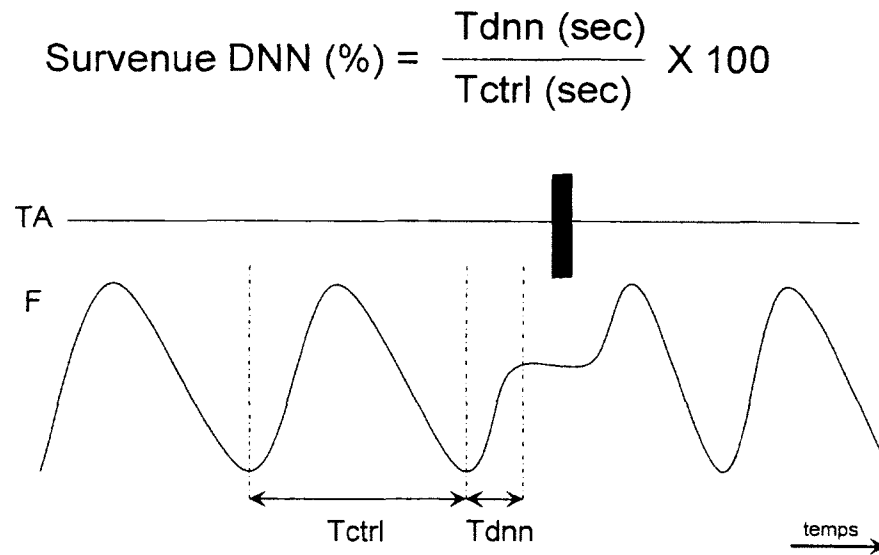


Figure 10 : Procédure de calcul de la méthode quantitative de classification des DNN. Tctrl : durée du cycle contrôle en secondes. Tdnn : durée entre le début de l'inspiration et le début de la DNN. TA : activité électrique du muscle thyroaryténoïdien (DNN). F : Flux nasal (l'inspiration correspond à l'ascension de la courbe et l'expiration à la descente).

Grâce à la classification qualitative, notre laboratoire a pu caractériser la coordination DNN-respiration chez le modèle ovin dans la première semaine de vie sans contention ni sédation. Chez l'agneau nouveau-né (figure11), les déglutitions de type ii prédominent avec les DNN de type ei, suivi des types ie et ee, que ce soit chez les agneaux nés à terme ou prématurés (Reix et al. 2003 ; Reix et al. 2004).

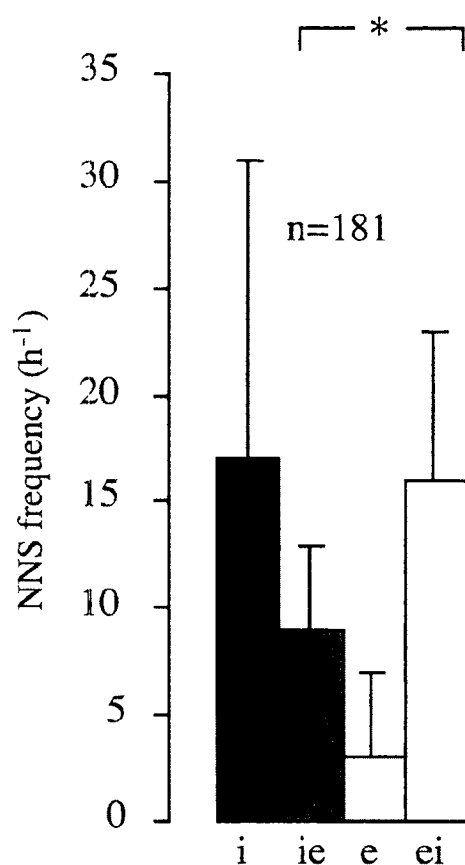


Figure 11 : Classification descriptive des DNN chez l'agneau nouveau-né à terme à l'éveil d'après Reix et al. 2003. Résultats basés sur l'étude de 181 déglutitions observées chez 6 agneaux éveillés et présentés sous forme de moyenne  $\pm$  déviation standard. i : DNN de type ii, ie : DNN de type ie, e : DNN de type ee, ei : DNN de type ei. \*P < 0.05 (test de poisson).

D'autres modèles ont aussi été étudiés mais à l'âge adulte. Chez les chèvres adultes non contentionnées, non sédationnées, le type ii prédomine avec 45% des DNN (Feroah et al. 2002). Il en est de même chez le lapin adulte (McFarland et Lund, 1993), chez le chien, le chat et le singe adulte (Doty et Bosma, 1956 ; Kawasaki et al. 1964) ou le type inspiratoire prédomine.

Au contraire, chez l'homme adulte, les DNN de type expiratoire prédominent et les DNN inspiratoires sont en minorité (Nishino et al. 1985 ; Smith et al. 1989 ; Martin et al. 1994 ; Palmer et Hiiemae, 2003), ceci permettant une meilleure protection des VAI chez l'humain et une facilité dans l'élévation du larynx (McConnel et al. 1986, Cook et al. 1989, Charbonneau et al. 2005). Chez les bébés prématurés étudiés à l'âge de leur terme,



l'analyse qualitative de la coordination DNN-respiration révèle une prédominance des déglutitions survenant durant une pause respiratoire (supérieure à 3 secondes  $\approx$  apnée), suivies par les déglutitions de type expiratoire offrant une meilleure protection des VAI (Nixon et al. 2008). Les déglutitions survenant durant les transitions de phase respiratoire, soit les types ie et ei, sont décrits comme plus à risque d'aspiration trachéale (Wilson et al. 1981 ; Paydarfar et al. 1986 ; Lewis et al. 1990).

Plusieurs études sur les DNN durant le sommeil ont étudié le rôle potentiel des déglutitions dans la genèse des apnées. La survenue prédominante des DNN, particulièrement en bouffées, (Menon et al. 1984 ; Pickens et al. 1988 ; Pickens et al. 1989 ; Nixon et al. en 2008) pourrait suggérer que les déglutitions induisent les apnées. Cependant, dans d'autres études, il apparaît que les déglutitions sont déclenchées après le début de l'apnée chez l'enfant (Menon et al. 1984 ; Nixon et al. 2008) et chez l'agneau prématuré (Reix et al. 2004), suggérant plutôt que les DNN ont un rôle protecteur des VAI durant l'apnée.

Un des objectifs concernant la coordination déglutition-respiration était de savoir s'il existait une maturation de cette fonction avec l'âge. Les études précédemment citées semblent dire que chez l'homme adulte (Nishino et al. 1985 ; Palmer et Hiimeae, 2003) et chez l'enfant (Nixon et al. 2008) les déglutitions expiratoires prédominent et qu'il n'existe pas de maturation de cette fonction avec l'âge. Mais, qu'en est-il chez les animaux comme le mouton ? Une réponse à cette première question est apportée par une étude qualitative ne démontrant aucune évolution de la coordination DNN-respiration lors du passage d'agneau nouveau-né à mouton adulte, où les DNN de type inspiratoire prédominent toujours (Roberge et al. 2007).

Concernant toujours la coordination déglutition-respiration, une grande différence est faite si l'on compare les animaux et l'être humain. En effet, les déglutitions de type inspiratoire prédominent chez les animaux, alors que les déglutitions de type expiratoire sont les plus fréquentes chez l'homme. Ces résultats opposés soulèvent une hypothèse (McFarland et al. 1994): y a-t-il une influence de la posture sur la coordination DNN-respiration (animaux quadrupèdes Vs homme bipède) ? L'hypothèse voulant qu'il y ait un effet de la posture sur la coordination DNN-respiration est partiellement validée par une étude chez l'humain adulte à l'éveil (Samson et al. données non publiées). En effet, il semble premièrement que

chez les femmes, les déglutitions de type ee et ei soient plus nombreuses que chez les hommes dont les types expiratoires prédominent aussi. Deuxièmement, les femmes initient leurs DNN plus tard en expiration que les hommes, spécialement en position quadrupède. Et troisièmement, chez les femmes, la position quadrupède retarde les DNN en expiration en comparaison avec les positions allongée et assise.

## Chapitre 5 : Stress environnemental et déglutitions

Comme expliqué dans le paragraphe précédent, la coordination déglutition-respiration demeure une fonction physiologique cruciale. En effet, une mauvaise coordination peut être délétère en favorisant les apnées ou en perturbant la protection des VAI. De plus, la déglutition et la respiration ayant des centres bulbaires en commun et utilisant toutes deux les VAS, nous sommes à même de penser que toute perturbation de l'une ou l'autre fonction peut modifier cette coordination. Il est donc concevable que tout stress respiratoire, toute inflammation des VAS (tabac) pourrait être une cause de déséquilibre de la coordination. Ainsi, de nombreuses pathologies rencontrées en unité de soins intensifs pédiatriques induisant une certaine hypoxémie et/ou hypercapnie pourraient être potentiellement délétères. Parmi ces pathologies, on peut compter la maladie des membranes hyalines, les malaises graves du nourrisson, la dysplasie broncho-pulmonaire, la pneumonie, la bronchite, etc. De plus, l'hypoxie est aussi rencontrée dans des situations de la "vie normale" comme le passage sur le ventre durant le sommeil, l'obstruction des VAS par un élément de literie ou encore un voyage en avion (pression de cabine moyenne du Boeing 747 = 632 mmHg à une altitude de croisière de 10000 m ; Kelly et al. 2007).

L'hypoxie rencontrée dans ces différentes pathologies ou situations de la vie normale provient d'un déséquilibre entre les apports et les besoins en oxygène de l'organisme se traduisant par une baisse de la concentration en oxygène dans le sang (hypoxémie). Une relation étroite existe bel et bien entre DNN et hypoxie au niveau du NTS. En effet, le message hypoxique est intégré au niveau du NTS en utilisant le glutamate et ses récepteurs NMDA comme neurotransmetteur dans un phénomène appelé la boucle glutamate/NO (Haxhiu et al. 1995). De même, le glutamate et les récepteurs NMDA sont impliqués dans la déglutition (Kessler et Jean, 1991). Il a été démontré qu'une micro-injection de glutamate au niveau du NTS peut induire à elle seule la déglutition (Kessler et al. 1990). Cette relation hypoxie/DNN semble donc d'origine centrale (Doty, 1951). Une relation de causalité entre hypoxie et déglutition est aussi suggérée par la diminution de fréquence des déglutitions lors d'un stress hypoxique isocapnique chez le chat anesthésié, curarisé,

vagotomisé et ventilé, indépendamment de l'activité des nerfs phréniques et laryngés supérieurs (Nishino et al. 1986).

Des situations d'hypercapnie (augmentation de la concentration sanguine en  $\text{CO}_2$ ) sont aussi observées chez le nouveau-né atteint de dysplasie broncho-pulmonaire, maladie des membranes hyalines, couché sur le ventre, en train de s'étouffer avec ses couvertures, etc. Si la littérature nous montre que l'hypercapnie n'a pas d'effet sur le nombre de déglutitions chez le chat anesthésié, curarisé, vagotomisé et ventilé (Nishino et al. 1986), elle nous démontre (figure 11) sa capacité à modifier la coordination et à stimuler les DNN en bouffées chez l'humain adulte non anesthésié (Nishino et al. 1998). En effet, cette étude montre qu'en normocapnie (air ambiant), les DNN majoritaires sont de type ee et ie alors qu'à 1,5% de  $\text{CO}_2$  mélangé à l'air inspiré, les DNN majoritaires sont de type ei et une diminution importante des DNN de type ee est observée (figure 12).

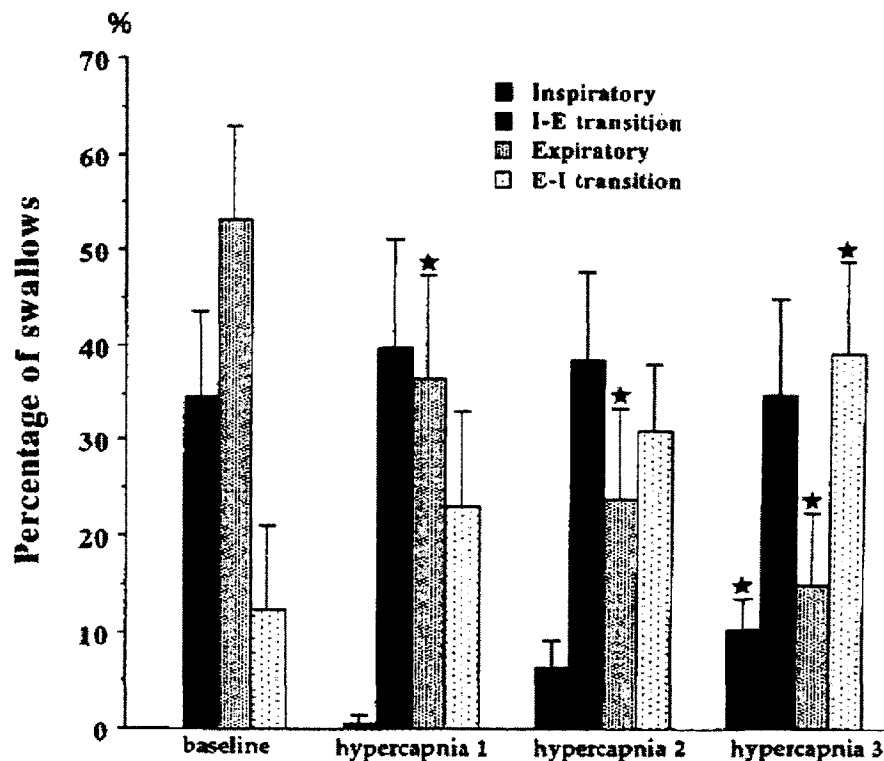


Figure 12 : Modification de la coordination DNN-respiration chez l'humain adulte suite à un stress hypercapnique d'intensité croissante. Baseline : contrôle. Hypercapnia 1 :  $\text{CO}_2$  0,5%. Hypercapnia 2 :  $\text{CO}_2$  1%, hypercapnia 3 :  $\text{CO}_2$  1,5% (Nishino et al. 1998).

Depuis le lancement en 1992 de la campagne préconisant de faire dormir les bébés en décubitus dorsal "Bébé sur le dos" par l'association américaine de pédiatrie, le syndrome de mort subite du nourrisson (SMSN) a été réduit de 50 à 90% (Moon et Fu, 2007). La fumée secondaire de cigarette est maintenant considérée comme le facteur de risque numéro un du SMSN au même titre que l'est la prématurité (Liebrechts-Akkerman et al. 2011). En effet, certains chiffres avancent un risque multiplié par cinq pour une exposition prénatale à la fumée secondaire et par deux à trois pour une exposition uniquement postnatale (Anderson et al. 1997, Hafstrom et al. 2005). Un fait marquant reste la découverte de fortes concentrations de nicotine dans les poumons des enfants décédés du SMSN. Quelques chiffres d'impact montrent bien l'implication du tabac dans les problèmes de grossesse et de développement de l'enfant. En effet, selon Santé Canada, non seulement le tabagisme durant la grossesse réduit de 20 à 30 % la fécondité des femmes, mais il augmente aussi de 20% le risque de fausses couches. De plus, le risque de prématurité augmente de 60% et le risque d'avoir un enfant de bas poids à la naissance est multiplié par deux, le rendant plus vulnérable aux infections et autres problèmes de santé. Fait notable selon Santé Canada, 10% des décès périnataux seraient attribuables au tabagisme maternel durant la grossesse. En terme d'exposition prénatale, une étude espagnole rapporte qu'environ 25% des femmes fumeraient pendant la grossesse et que 56% des enfants de 6 à 8 ans sont exposés en postnatal (Salvador et al. 2004). Aux États-Unis, les chiffres avancent des données d'exposition entre 35 et 80% selon de la population étudiée (Kum-Nji et al. 2006)

Sur le plan physiologique, la nicotine augmente les reflux gastro-oesophagiens chez l'adulte et favorise les infections des VAS en diminuant la concentration d'interleukine 10 au niveau buccal. De plus, la nicotine module les voies de transmission cholinergique, catécholaminergique et sérotonergique du tronc cérébral et des chémorécepteurs périphériques, notamment au niveau des centres cardio-respiratoires impliqués dans le SMSN, dont le NTS (Holger et al. 1995 ; Tolcos et al. 2000). Un lien a aussi été établi dans la littérature entre tabac et déglutition. En effet, une étude chez l'humain adulte, bien que ne montrant pas de différence entre les fumeurs et non-fumeurs en terme de nombre de déglutitions, a démontré qu'un plus grand volume d'eau était nécessaire pour déclencher les déglutitions chez les fumeurs (Dua et al. 1998 ; Dua et al. 2002). Est-ce via

l'inflammation des VAS, notamment de la région laryngée ? Cependant, jusqu'à présent, une seule étude fait mention des effets de la fumée secondaire sur la déglutition en période néonatale (St-Hilaire et al. 2010). Cette étude effectuée chez l'agneau nouveau-né à terme démontre qu'une exposition de 16 jours à la fumée secondaire modifie les chémoréflexes laryngés dans le sens d'une augmentation de la fréquence et de la durée des apnées, une diminution des réactions d'éveil et une diminution des déglutitions lors de la stimulation de la muqueuse laryngée par différents liquides (HCl, eau, lait).

**Remarque :** Le SMSN se définit comme le décès imprévisible d'un nourrisson avant l'âge d'un an durant le sommeil qui reste inexpliqué même après une revue approfondie du dossier médical, de la scène du décès et une autopsie standardisée faite par un spécialiste du SMSN (Bajanowski et al. 2007). Dans les pays développés, le SMSN est la première cause de décès chez les nouveau-nés entre un mois et un an (Moon et Fu, 2007). Un début d'explication de ce syndrome est présenté sur la base d'une théorie dite du triple risque toujours d'actualité depuis 1994 comme présentée à la figure 13 (Filiano et Kinney 1994 ; Guntheroth et Spiers, 2002). Cette théorie propose que cet événement tragique nécessite la coïncidence temporelle de trois conditions. La première condition non modifiable est **l'âge du nouveau-né**. En effet, il existe une période de vulnérabilité maximale entre l'âge de 2 et 4 mois, durant laquelle le contrôle autonome cardiorespiratoire est précaire (Kinney, 2005 ; Kinney et al. 2009). La deuxième condition nécessite une certaine **prédisposition** incluant la présence d'anomalies fonctionnelles souvent causées par des facteurs prénataux et/ou postnataux comme le tabagisme maternel, la consommation de drogue ou d'alcool, des facteurs dits non modifiables comme la prématurité, le sexe masculin, la race ou encore certains polymorphismes génétiques (Hunt et Hauck, 2006 ; Moon et Fu, 2007 ; Kinney et al. 2009). Cette notion inclut aussi les facteurs épigénétiques qui modifie l'expression de certains gènes lors de l'exposition à certains stress (Hunt, 2005). Il est intéressant de comprendre que ces facteurs de vulnérabilité/prédisposition peuvent perturber le contrôle respiratoire, la sensibilité au CO<sub>2</sub> et/ou à l'O<sub>2</sub> et les réactions d'éveil (Kinney et al. 2009). La troisième condition est la présence d'un **événement déclencheur** aigu comme une infection par le virus respiratoire syncytial (VRS), un RGO avec pénétration laryngée ou

aspiration trachéale, un épisode hypoxique/hypercapnique lorsque l'enfant s'étouffe, etc. Plus précisément, nous pensons qu'une mauvaise coordination DNN-respiration pourrait être à l'origine d'autres facteurs déclencheurs comme les aspirations et les apnées.

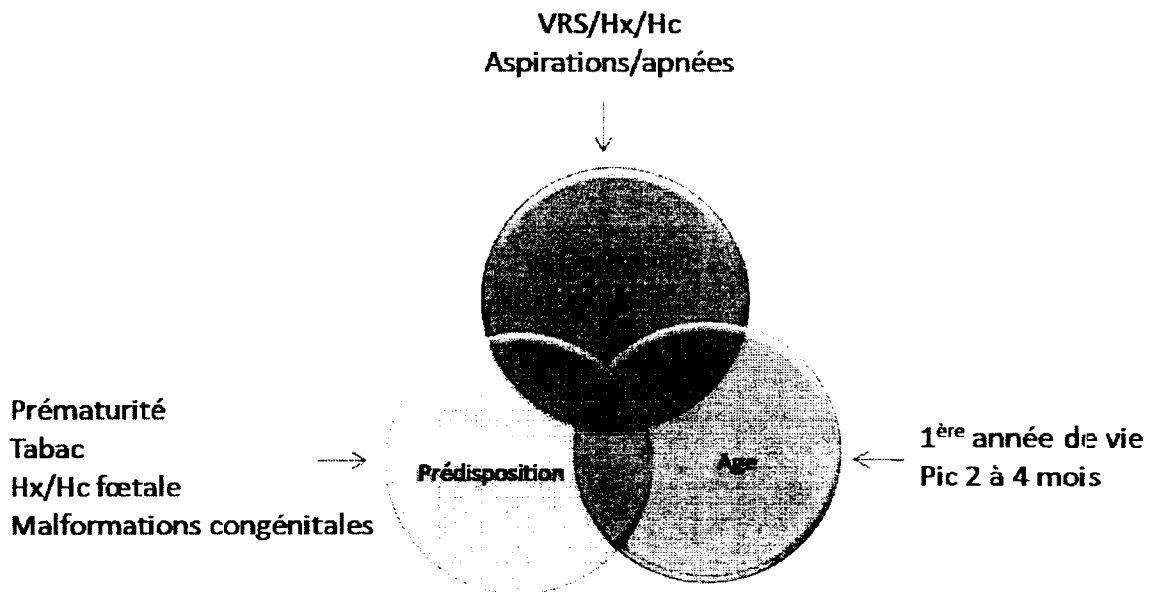


Figure 13 : Schéma de la théorie du triple risque associée au syndrome de mort subite du nourrisson. VRS : virus respiratoire syncytial. Hx : hypoxie. Hc : Hypercapnie.

## **Chapitre 6 : Objectifs et hypothèses de ce projet de doctorat**

Ce projet de doctorat fait suite à l'étude de Samson et al. 2005 visant à tester la robustesse de la coordination DNN-respiration dans les différents stades de conscience durant l'exposition à une CPAP nasale. Ce projet de doctorat s'aligne sur l'étude de l'effet de différents stress fréquemment rencontrés en néonatalogie sur la robustesse de la coordination DNN-respiration.

### **I. Influence de l'hypoxie et de l'hypercapnie sur la coordination DNN-respiration**

L'objectif principal de cette étude est de caractériser l'effet de l'hypoxie (10% FiO<sub>2</sub>) et de l'hypercapnie (5% FiCO<sub>2</sub>) sur la coordination DNN-respiration durant une exposition aiguë chez l'agneau nouveau-né à terme. L'hypothèse évoquée est que ces deux stress respiratoires perturbent non seulement la fréquence des DNN mais aussi leur coordination avec la respiration.

Les objectifs secondaires sont :

1. L'étude de la fréquence et de la durée des apnées.
2. L'étude de l'influence des stades de conscience.

### **II. Influence de l'exposition postnatale à la fumée secondaire de cigarette sur la coordination DNN-respiration**

Cette étude s'est faite en deux temps. Dans un premier temps, la mise au point et la validation d'une machine à fumer automatique ont fait l'objet d'une publication incluse dans cette thèse. Dans un deuxième temps, l'objectif principal de cette étude a été de



caractériser l'effet d'une exposition postnatale de 15 jours à la fumée de cigarette sur la coordination DNN-respiration chez l'agneau nouveau-né. L'hypothèse principale évoquée est que la fumée de cigarette modifie la fréquence des DNN et leur coordination avec la respiration.

Les objectifs secondaires étaient :

1. L'étude de la fréquence et de la durée des apnées.
2. L'étude de l'influence des stades de conscience.

**MATERIEL ET METHODES**

**RESULTATS**

Article 1:

## **EFFECTS OF HYPOXIA AND HYPERCAPNIA ON NON-NUTRITIVE SWALLOWING IN NEWBORN LAMBS**

Duvareille C, Lafrance M, Samson N, St-Hilaire M, Pladys P, Micheau P, Bournival V, Langlois C, Praud J-P.

Publié dans Journal of Applied Physiology. 2007; 103(4); 1180-8.

Résumé :

Les DNN sont essentielles pour la clairance des sécrétions salivaires et des reflux gastro-pharyngés des VAS, spécialement en période néonatale. La parfaite coordination entre DNN et respiration est un élément clé dans la prévention des aspirations et des apnées prolongées. De plus, il est à noter que les problèmes d'origine respiratoire et digestive sont les problèmes les plus fréquents en période néonatale. Cependant, les études sur la coordination DNN-respiration en période néonatale restent rares. Le but de cette étude est d'observer les effets de l'hypoxie (Hx 10% O<sub>2</sub>) et de l'hypercapnie (Hc 5% CO<sub>2</sub>) sur la fréquence des DNN et la coordination DNN-respiration chez l'agneau nouveau-né.

Matériel et méthodes : six agneaux ont été instrumentés de façon chronique sous anesthésie générale pour l'enregistrement d'un électrocardiogramme, des mouvements oculaires, d'un électro-corticogramme, du flux nasal et de l'activité des muscles thyroaryténoïdiens (constricteurs de la glotte) par téléométrie. Des enregistrements polysomnographiques ont été effectués chez les agneaux nouveau-nés sans sédation ni contention exposés en aigu à l'Hx ou l'Hc et en condition contrôle (air ambiant).

Résultats : l'hypercapnie augmente la fréquence des DNN durant l'éveil et le sommeil calme ( $P < 0.005$ ), alors que l'hypoxie tend à la diminuer. De plus, l'hypercapnie modifie la coordination DNN-respiration en augmentant la fréquence des DNN de type ie ( $P < 0.001$ ). En outre, l'hypercapnie diminue aussi la fréquence des apnées en éveil et durant le sommeil calme ( $P = 0.002$ ).

Conclusion: l'hypercapnie stimule la fréquence des DNN en faveur du type ie alors que l'hypoxie a une tendance inverse, quel que soit le stade de conscience.

Contributions :

Pour cet article, j'ai réalisé toutes les étapes menant à sa rédaction allant de la mise au point du projet sur le plan expérimental à la rédaction de cet article en passant par les expérimentations et l'analyse des résultats, le tout supervisé par mon directeur de recherche Dr Praud.

Nathalie Samson, Marie St-Hilaire et Véronique Bournivale ont contribué aux chirurgies pour l'instrumentation des agneaux et l'enregistrement des polysomnographies. Mylène Lafrance et Patrick Pladys ont fortement contribué à l'analyse et au calcul spécifique des temps inspiratoires et expiratoires. Philippe Micheau en temps que professeur en génie mécanique nous a aidé à concevoir le caisson d'exposition.

**EFFECTS OF HYPOXIA AND HYPERCAPNIA  
ON NON-NUTRITIVE SWALLOWING IN NEWBORN LAMBS**

**Charles Duvareille<sup>1</sup>, Mylène Lafrance<sup>1</sup>, Nathalie Samson<sup>1</sup>, Marie St-Hilaire<sup>1</sup>,  
Patrick Pladys<sup>2,3,4</sup>, Philippe Micheau<sup>5</sup>, Véronique Bournival<sup>1</sup>, Carole  
Langlois<sup>1</sup>, Jean-Paul Praud<sup>1</sup>**

1. Neonatal Respiratory Research Unit, Departments of Pediatrics and Physiology,  
Université de Sherbrooke
2. INSERM, U642, Rennes, F-35000, France
3. Université de Rennes 1, LTSI, Rennes, F-35000, France
4. CHU Rennes, Département de médecine de l'enfant et de l'adolescent,  
néonatalogie, Rennes, F-35000, France
5. Department of Mechanical Engineering, Université de Sherbrooke

Running title: Hypercapnia, hypoxia, and swallowing

Address for correspondence

Jean-Paul Praud MD PhD  
Departments of Pediatrics and Physiology  
Université de Sherbrooke  
J1H 5N4 - QC – Canada  
Email : [Jean-Paul.Praud@USherbrooke.ca](mailto:Jean-Paul.Praud@USherbrooke.ca)  
Fax: 1 (819) 564-5215  
Phone: 1 (819) 346-1110, ext 14851

## **ABSTRACT**

The aim of the present study was to investigate the effect of hypercapnia and hypoxia on apnea and non-nutritive swallowing (NNS) frequency as well as on the coordination between NNS and phases of the respiratory cycle in newborn lambs, whilst taking into account the potential effects of states of alertness. Six lambs were chronically instrumented for recording electroencephalogram, eye movements, diaphragm and thyroarytenoid muscle (a glottal adductor) activity, nasal airflow and electrocardiogram. Polysomnographic recordings were performed in non-sedated lambs exposed to air (control), 10% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> in a random order at 3, 4 and 5 days of age. While hypercapnia decreased apnea frequency in wakefulness and active sleep ( $p = 0.002$  vs. air and hypoxia), hypoxia had no significant effect on apnea. In addition, while hypercapnia increased NNS frequency during wakefulness and quiet sleep ( $p < 0.005$  vs. air and hypoxia), hypoxia tended to decrease the frequency of NNS. Finally, only hypercapnia altered NNS-breathing coordination by increasing NNS occurring at the transition from inspiration to expiration (*ie*-type NNS) ( $p < 0.001$  vs. air and hypoxia). In conclusion, whereas hypercapnia increases overall NNS frequency by specifically increasing *ie*-type NNS, hypoxia has the inverse tendency. Results were identical in all three states of alertness.

**Keywords:** control of breathing, apneas, thyroarytenoid muscle, sleep, radiotelemetry.

## INTRODUCTION

Non-nutritive swallowing (NNS) is essential for clearing upper airway secretions and gastro-pharyngeal refluxes, which are especially frequent in the neonatal period due to the immaturity of the inferior esophageal sphincter. In addition, a perfect NNS-breathing coordination is thought to be crucial to prevent aspiration and apnea (27). Consequences of respiratory and swallowing immaturity are the most frequent problems encountered in newborns. However, studies on NNS and NNS-breathing coordination in the neonatal period are surprisingly rare. We have recently reported on spontaneous NNS frequency throughout the three states of alertness, as well as NNS-breathing coordination in both full-term (34) and preterm lambs (33). Both NNS and respiration share a common aerodigestive tract (the upper airways) and their central pattern generator (CPG) is located in the same medullary site. It is thus conceivable that any adverse condition, such as hypercapnia or hypoxia, which alters breathing in the newborn, may influence NNS frequency and the precise NNS-breathing coordination, and consequently promote lung aspiration and/or respiratory instability. In addition, postnatal maturation of both swallowing and NNS-breathing coordination may be altered by these conditions, due to the high neural plasticity present at this period.

Only two studies, conducted at adult age, have investigated the effects of hypercapnia or hypoxia on swallowing. Results on the effects of hypercapnia have been contradictory. Indeed, while no effects of hypercapnia were observed on the swallowing reflex in anesthetized cats (26), a decrease in the swallowing reflex and a compromised coordination between (induced) NNS and respiration were reported in human adults (25). Regarding hypoxia, the only available study showed a decrease in the swallowing reflex in anesthetized cats, no results being available on NNS-breathing coordination (26). In addition, there is no available study to our knowledge on the effects of hypercapnia or hypoxia in the neonatal period. Thus, the aim of the present study was to investigate the effects of hypercapnia as well as hypoxia on spontaneous NNS frequency and NNS-breathing coordination in newborn lambs, testing the hypothesis that these conditions decrease NNS frequency in the three states of alertness and modify NNS-breathing coordination.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

Six mixed-breed lambs were involved in the study. All lambs were born at term by spontaneous vaginal delivery at our local provider's farm and housed with their mother in our animal quarters before initial experiments. The study protocol was approved by the Université de Sherbrooke's Committee for Animal Care and Experimentation.

### **Surgical preparation**

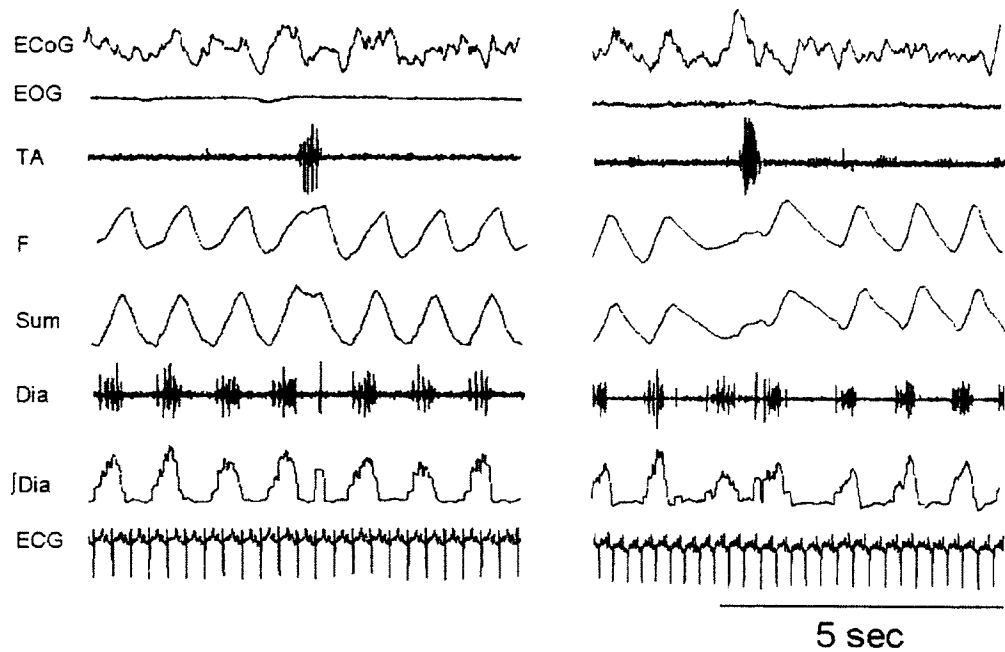
Aseptic surgery was performed on the second day of life under general anesthesia (Isoflurane 1-2% + NO<sub>2</sub> 30% + O<sub>2</sub> 68%). Intramuscular atropine sulfate (150µg/kg) was given preoperatively with ketamine (10mg/Kg) and midazolam 100µg/Kg. Antibiotics (5mg/kg gentamicin and 7500 UI/kg duplocillin) were administered intramuscularly before surgery and daily thereafter until the end of the experiment. One dose of ketoprofen (3mg/kg intramuscularly) was systematically given immediately after induction of anesthesia for analgesia and repeated if needed the next day. Chronic instrumentation included placement of bipolar, gold plated stainless steel electrodes into the two thyroarytenoid muscles (TA, a glottal adductor) through the lateral aspect of the thyroid cartilage as well as placement of bipolar enameled chrome wires into the diaphragm for recording electromyographic activity (TA and DI EMG respectively). Two right-angled, platinum needle-electrodes (E7-12, Grass Instruments Company, Quincy, MA) were inserted into the parietal cortex directly through the skull, at the level of the lambda suture, 1 cm from the midline, for electrocorticogram (ECoG) recording. One platinum needle-electrode (E2-12, Grass Instruments Company, Quincy, MA) was also inserted under the scalp as a ground. Two other E2-12 platinum needle-electrodes were inserted subcutaneously on the proximal forelegs for recording electrocardiogram (ECG). Leads from all electrodes were subcutaneously tunneled to exit on the back



of the lamb. Furthermore, an arterial catheter was introduced in the brachial artery to collect blood samples for measuring pH, PO<sub>2</sub> and PCO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration and hemoglobin saturation. Correct electrode positioning was systematically verified at autopsy.

### **Recording equipment**

The recording instrumentation was completed immediately prior to the recording session in non-sedated lambs. Platinum needle electrodes were inserted subcutaneously into the outer upper region and in the inner region of the right eye socket for electrooculogram (EOG) recording. Nasal airflow was recorded using a type J thermocouple wire (Omega Engineering, Stamford, CO, USA; response time 0.002 sec; accuracy 0°C-816°C) glued to the side of one nostril. Respiratory inductance plethysmography was used to monitor respiratory thoraco-abdominal movements. Inspiratory and expiratory fraction of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> (FiO<sub>2</sub>, FiCO<sub>2</sub>, FeO<sub>2</sub> and FeCO<sub>2</sub>) were continuously monitored in all lambs using a nasal cannula connected to a Capnomac II (Datex-Ohmeda Canada Inc, Mississauga, ON, Canada). Our specifically-designed radiotelemetry system was used to obtain data from prolonged recordings (with periods of wakefulness and sleep) in freely-moving, non-sedated lambs (18). The transmitter utilized in this study was comprised of 8 differential channels for nasal flow, ECG, EOG, ECoG and 4 EMG recordings. All transmitted signals were fed from the receiver to the acquisition system. The raw EMG signals were rectified, integrated and averaged (moving time average = 100 ms). The telemetry transmitter was connected to the electrode leads and attached to the lamb's back. Polysomnographic signals were recorded on a PC (Figure 1), using a computerized acquisition device (MP100A, Biopac Systems Inc, Santa Barbara, CA, USA) and software (Acknowledge 3.7.3, Biopac Systems Inc.).



**Figure 1:** Example of recording obtained in one lamb in quiet sleep during hypercapnic gas mixture breathing. **ECoG**, electrocorticogram; **EOG**, electrooculogram; **TA**, thyroarytenoid muscle electromyographic activity; **F**, nasal airflow (inspiration upward); **Sum**, sum signal of the respiratory inductive plethysmograph; **Dia**, diaphragm electromyographic activity; **]Dia**, moving time averaged Dia; **ECG**, electrocardiogram.

### Design of the study

Lambs were studied without sedation 48 h after surgery (age:  $4 \pm 1$  day, weight:  $3.9 \pm 0.5$  kg), between 6:00 AM and 11:30 AM. The lambs were housed with their mother and fed and slept *ad libitum* until and between the experiments. Standard light cycle, *i.e.*, light extinction between 6:00 PM and 6:00 AM, was maintained throughout the experimental days. All recordings began at least 40 minutes after their last feeding. Each lamb underwent three recordings on three subsequent days, while in a plexiglas chamber (volume  $1.2 \text{ m}^3$ ). The chamber was continuously flowed (12 L/min) with either medical air or 21%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$  (hypercapnia, Hc) or 10%  $\text{O}_2$  + 0%  $\text{CO}_2$  (hypoxia, Hx). Consistency of the gas mixture in the chamber was monitored throughout the recording using both an oximeter and a capnometer (Sable Systems  $\text{O}_2$  FC-1B and  $\text{CO}_2$  CA-1B, Las

Vegas, NA, USA). Each day corresponded to a different gas mixture, administered in random order. The chamber temperature (24°C) and humidity (70%) were maintained constant throughout the recordings. Lambs were monitored throughout the three experimental sessions, and an observer was always present in the laboratory to note all events. In wakefulness, they were standing or lying on the floor of the exposure chamber, with the head up; in quiet sleep, they were lying on the floor, usually with the head at 180 degree put on their own back; in active sleep, they were lying with the head and neck extended on the floor.

Three additional lambs were studied after addition of holes for hermetic gloves in two opposite walls of the chamber, to enable manipulation of the lambs throughout the experiment without opening the chamber. The lambs were studied in the same three experimental conditions, to assess variations in blood gases, saliva secretion and body temperature. Saliva production was measured using a custom made collecting system consisting in a cotton ball inserted on a hairpin weighted (Professional digital mini scale SL-50/150/300; Mississauga, ON, Canada) before and after insertion in the lamb's mouth, between the lower gums and the left cheek; the cotton ball was left in place during 30 sec at a time, four times during each recording. The four samples of saliva obtained were added and averaged, and saliva flow was expressed per minute in each lamb in each of the three gas conditions. In addition, variations in metabolism were also measured in these 3 lambs using the indirect calorimetric method.

### **Data analysis**

Standard electrophysiological and behavioral criteria were used to define wakefulness (W), quiet sleep (QS) and active sleep (AS) from ECoG and EOG tracings, together with careful, continuous lamb observation (35). Lambs were standing or lying, Arousal from QS was characterized by sudden disappearance of high-amplitude waves in the ECoG for at least 3 sec, and arousal from AS was recognized by direct observation of the lamb and disappearance of intense EOG activity. Percentage of time spent in each state of alertness, mean duration and

frequency of W, QS and AS epochs and arousal frequency were calculated. Respiratory and heart rates were calculated for all epochs of W, QS and AS recorded in all lambs, when at least 60 seconds were spent in that epoch. Apneas were defined as two “missed” breaths, as compared to the two preceding respiratory cycles. Sighs (*i.e.*, augmented breaths) were defined as an increase in the amplitude of diaphragmatic EMG of at least twofold, as compared to the three preceding respirations. Apnea and sigh frequency (number per hour of recording) were calculated in the three states of alertness. Non-nutritive swallowing activity was recognized by a brief, high amplitude TA EMG burst with interruption of nasal airflow, as previously validated (32). Analysis of NNS from TA EMG signal alone was then pursued as follows. First, total NNS (including both isolated NNS and NNS occurring in bursts) frequency was calculated for each state of alertness and first averaged for each individual lamb, then for the entire group as a whole for each gas mixture. Total NNS were then separated into isolated NNS and NNS occurring in bursts, defined as the occurrence of at least 2 NNS within 4 seconds (38). Calculation of NNS frequency during wakefulness was restricted to periods of quiet wakefulness. Secondly, diaphragmatic EMG, the sum signal of the respiratory inductance plethysmograph and nasal airflow traces were used to recognize the phase of the respiratory cycle disrupted by NNS. Non nutritive swallows were then classified depending on the respiratory phase preceding and following NNS, as previously described (34). Four types of NNS were defined: e-type NNS (preceded by and followed by expiration), ei-type NNS (at the transition from expiration to inspiration), ie-type NNS (at the transition from inspiration to expiration), and i-type NNS (preceded by and followed by inspiration). Only NNS with good quality signals were analyzed for this purpose. NNS frequency was then calculated for each type of NNS, in each state of alertness. Furthermore, to explain the increase in *ie*-type NNS during Hc (see results), the relationship between respiratory rate (RR) and *ie*-type NNS percentage was analyzed during air breathing. For each NNS, RR was measured from the 3 preceding breaths and *ie*-type NNS percentage was calculated for each interval of five breaths.min<sup>-1</sup>. Finally, for each isolated NNS, alterations in respiratory timing were further assessed by measuring the inspiratory

time ( $T_i$ ), expiratory time ( $T_e$ ), total breathing duration ( $T_{tot}$ ) and duty cycle  $T_i/T_{tot}$ . The effect of NNS type on respiratory timing was assessed on the breath before ( $n-1$ ), during ( $n$ ) and after ( $n+1$ ) the swallow and compared during air breathing, hypoxia and hypercapnia. All values of respiratory timing were expressed as the percentage of the control value measured on the  $n-3$  breath for each NNS type.

All results were first averaged for each individual lamb, then for the entire group as a whole for each gas mixture. All measurements were performed semi-automatically using the Acknowledge software.

### **Statistical analyses**

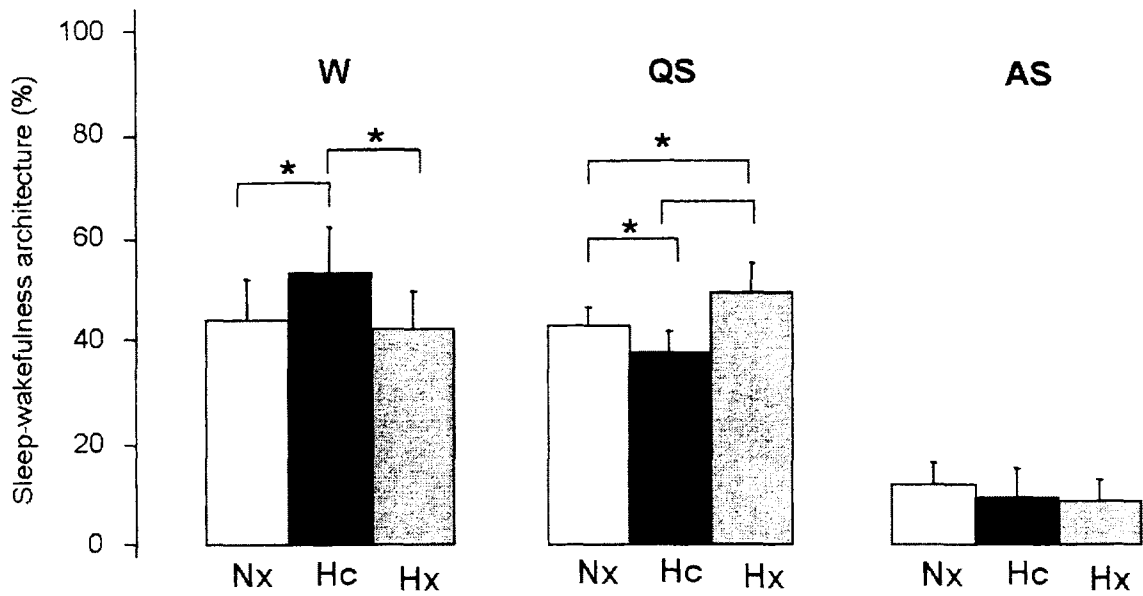
Statistical analyses were performed using SAS software as previously described (34). Normality was first tested for all variables using the Shapiro-Wilks test. Summary results are expressed as mean  $\pm$  SD. The mean effect of hypoxia or hypercapnia on sleep architecture, NNS frequency and NNS-breathing coordination, respiratory and heart rates, apnea and sigh frequency was estimated using generalized estimating equation models (GEE), *i.e.*, an approach which takes into account the correlated nature of repeated measures (GENMOD procedure of SAS). The working correlation structure selected was the exchangeable type. For data which followed a normal distribution (heart and respiratory rates), no transformations were made. For the remaining data, generalized linear models consisted in Poisson regression models. The results of p values were obtained using the z-statistics, which is a robust estimate of the standard error. Analyses of the relationship between respiratory rate and *ie*-type NNS percentage were performed using simple linear regression analysis. Results with p values less than 0.05 were considered significant.

## **RESULTS**

Total duration of polysomnographic recordings in 6 lambs was 24.4 h in air (mean  $\pm$  SD per lamb:  $4.1 \pm 0.2$  h), 24.6 h in hypercapnia (Hc) ( $4.1 \pm 0.5$ ), and 25.1 h in hypoxia (Hx) ( $4.2 \pm 0.6$ ). Arterial gas values, obtained in 3 additional lambs during air, 10%O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> breathing, were respectively PaO<sub>2</sub> =  $106 \pm 15$  mmHg,  $31 \pm 6$  mmHg and  $125 \pm 0.5$  mmHg; PaCO<sub>2</sub> =  $40 \pm 1$  mmHg,  $30 \pm 2$  mmHg and  $50 \pm 1$  mmHg; pH =  $7.45 \pm 0.01$ ,  $7.52 \pm 0.00$  and  $7.39 \pm 0.03$ ; [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] =  $26.5 \pm 1.5$  mmol/L,  $23.3 \pm 1.4$  mmol/L and  $29.0 \pm 1.2$  mmol/L. Measurements of basal metabolism obtained in those 3 lambs showed a decrease in oxygen consumption in Hx ( $10.5 \pm 0$  ml.min<sup>-1</sup>.Kg<sup>-1</sup>), as compared to both air ( $15 \pm 3$  ml.min<sup>-1</sup>.Kg<sup>-1</sup>) and Hc ( $17 \pm 5$  ml.min<sup>-1</sup>.Kg<sup>-1</sup>).

### **Sleep architecture**

Results are reported in figure 2 and table 1. Active sleep was obtained in all lambs in the three gas conditions. Overall, while Hc increased %W (= time spent in W, expressed as a percentage of the total recording time), Hx had no significant effect on %W. During sleep, while %QS decreased in Hc and increased in Hx, this was not related to a change in arousal frequency. Neither Hc nor Hx had a significant effect on %AS. Mean duration of W epochs was increased during Hc but not in Hx. Neither Hc nor Hx had a significant effect on the mean duration and frequency of QS and AS epochs.



**Figure 2:** Sleep-wakefulness architecture in air (white bars), hypercapnia (black bars) and hypoxia (gray bars). Values are reported as the percentage of total recording time spent in each state of alertness. **W:** Wakefulness; **QS:** Quiet Sleep; **AS:** Active Sleep. \*:  $p < 0.05$  ( $n = 6$ ).

**Table 1: Time spent in each state of alertness, frequency and mean duration of each epoch and arousal frequency during air, hypercapnia and hypoxia breathing (n = 6)**

	Air	Hc	Hx
% W	44 ± 8	<b>53 ± 9*†</b> (* 0.002; † < 0.0001)	42 ± 7.5 (* 0.5)
% QS	43 ± 4	<b>38 ± 4*†</b> (* < 0.0001; † < 0.0001)	<b>49 ± 6 *</b> (* 0.0004)
% AS	12 ± 4	9 ± 5 (* 0.2; † 0.7)	9 ± 4 (* 0.07)
W epoch duration (s)	120 ± 32	<b>180 ± 77</b> (* 0.0001; † < 0.0001)	111 ± 35 (* 0.3)
QS epoch duration (s)	148 ± 44	145 ± 33 (* 0.8; † 0.9)	144 ± 18 (* 0.8)
AS epoch duration (s)	109 ± 34	111 ± 67 (* 0.9; † 0.8)	100 ± 52 (* 0.8)
W epoch frequency (h <sup>-1</sup> )	14 ± 2	12 ± 3 (* 0.07; † 0.002)	14 ± 2 (* 0.4)
QS epoch frequency (h <sup>-1</sup> )	11 ± 3	10 ± 3 (* 0.1; † 0.002)	12 ± 2 (* 0.3)
AS epoch frequency (h <sup>-1</sup> )	4 ± 2	<b>3 ± 2</b> (* 0.04; † 0.7)	<b>3 ± 1</b> (* 0.004)
Arousal frequency QS (h <sup>-1</sup> )	22 ± 7	21 ± 9 (* 0.9; † 0.9)	22 ± 4 (* 0.9)
Arousal frequency AS (h <sup>-1</sup> )	30 ± 10	42 ± 27 (* 0.1; † 0.8)	38 ± 14 (* 0.3)

Wakefulness (**W**), Quiet Sleep (**QS**), Active Sleep (**AS**), Hypercapnia (**Hc**) and Hypoxia (**Hx**). Results are presented as mean ± SD, with p values as follows \* vs. air; † vs. hypoxia. Statistically significant values are indicated in bold.



### **Cardiorespiratory parameters**

Results are reported in table 2. Regardless of the state of alertness, respiratory rate was increased in both Hc and Hx, with no difference being observed between Hc and Hx. Most apneas were post-sigh apneas. A decrease in apnea and sigh frequency was observed in Hc during W and AS. Regardless of the state of alertness, Hx did not alter apnea or sigh frequency. While Hx induced an increase in heart rate in all states of alertness, the increase during Hc was significant in W only. Moreover, heart rate was higher in Hx than Hc.

### **Non-nutritive swallowing activity**

Results on NNS frequency are reported in table 3 and figure 3. Overall, Hc increased the frequency of total and isolated NNS in W and QS, as compared to air. While the same tendency was observed during AS, this increase was not statistically significant, due to high variability between lambs. On the contrary, the overall effect of Hx was a tendency towards a decrease in the frequency of total and isolated NNS, which reached significance only for isolated NNS during QS. Finally, neither Hc nor Hx significantly modified NNS burst frequency. Overall, Hc and Hx had an inverse effect on NNS frequency, with amplitude of the effect being greater for Hc than for Hx.

Results on NNS-breathing coordination are reported in table 4 and figure 4. In air, regardless of the state of alertness, *i*-type and *ie*-type NNS frequencies were not significantly different. Both were greater than *e*-type and *ei*-type NNS frequencies. Irrespective of the state of alertness, Hc consistently increased *ie*-type NNS at the expense of *i*-type NNS, with the consequence that *ie*-type NNS were by far the most frequent. By contrast, during Hx, alterations in NNS-breathing coordination, *i.e.*, a reduction in *ei*-type NNS during AS and in *i*-type NNS during QS, were inconsistent throughout all states of alertness.

***Respiratory rate and ie-type NNS percentage relationship.*** Results in figure 5 indicate a strong positive correlation between RR and *ie*-type NNS percentage during air breathing ( $R = 0.90$ ,  $p < 0.0001$ ), suggesting that hyperventilation per se was linked to an increase in the proportion of *ie*-type NNS. The same correlation

was observed during Hc and Hx (respectively  $R = 0.72$ ,  $p < 0.0001$ ;  $R = 0.69$ ,  $p = 0.001$ ).

**Table 2: Respiratory and heart rates, apnea and sigh frequency in air, and in hypercapnic and hypoxic conditions (n = 6)**

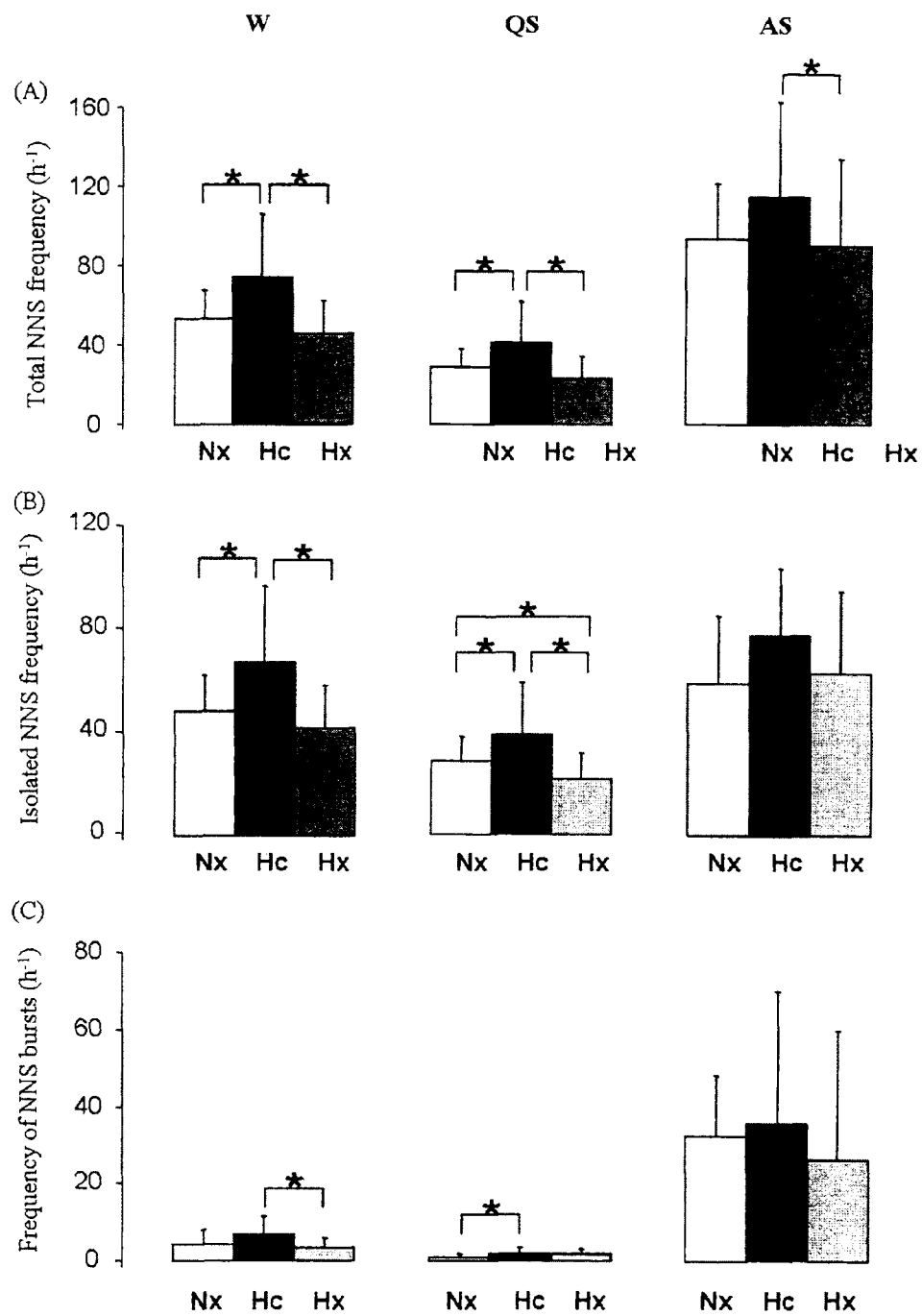
		Air	Hc	Hx
Respiratory rate (.min <sup>-1</sup> )	W	63 ± 21	<b>90 ± 30*</b> (* <0.0001; † 0.3)	<b>79 ± 22*</b> (* 0.002)
	QS	60 ± 22	<b>89 ± 29*</b> (* 0.0002; † 0.3)	<b>77 ± 26*</b> (* 0.0004)
	AS	61 ± 10	<b>77 ± 17*</b> (* <0.0001; † 0.9)	<b>77 ± 12*</b> (* 0.0001)
Heart rate (.min <sup>-1</sup> )	W	186 ± 41	<b>203 ± 44*†</b> (* 0.03; † 0.02)	<b>240 ± 27*</b> (* 0.002)
	QS	188 ± 41	202 ± 44† (* 0.1; † 0.02)	<b>242 ± 32*</b> (* 0.001)
	AS	168 ± 35	178 ± 30† (* 0.2; † <0.0001)	<b>210 ± 23*</b> (* 0.0002)
Apnea frequency (.h <sup>-1</sup> )	W	30.1 ± 19.3	<b>8.9 ± 9*†</b> (* 0.002; † 0.0008)	35.3 ± 31.6 (* 0.2)
	QS	6.7 ± 4.9	5.1 ± 4.6 (* 0.2; † 0.9)	5.3 ± 2.9 (* 0.3)
	AS	6.6 ± 5.8	<b>1.3 ± 2.0*†</b> (* 0.004; † 0.006)	20.8 ± 35.2 (* 0.07)
Sigh frequency (.h <sup>-1</sup> )	W	44.5 ± 17.5	<b>25.3 ± 9.9*†</b> (* 0.001; † 0.004)	40.6 ± 16.9 (* 0.6)
	QS	7.4 ± 4.6	8.9 ± 7.5 (* 0.2; † 0.2)	5.4 ± 2.9 (* 0.3)
	AS	16.5 ± 9.8	<b>7.5 ± 5.4*†</b> (* 0.03; † 0.02)	17.9 ± 12.2 (* 0.8)

Wakefulness (**W**), Quiet Sleep (**QS**), Active Sleep (**AS**), Hypercapnia (**Hc**) and Hypoxia (**Hx**). Results are presented as mean ± SD, with p values as follows \* vs. air; † vs. hypoxia. Statistically significant values are indicated in bold.

**Table 3: Frequency of total NNS, isolated NNS and NNS bursts in air and in hypercapnic and hypoxic conditions (n = 9)**

		Air	Hc	Hx
Total NNS frequency (.h <sup>-1</sup> )	W	53 ± 14; 30%	<b>74 ± 32*†</b> ; 33% (* 0.005; †0.0004)	46 ± 17; 29% (* 0.3)
	QS	29 ± 10; 17%	<b>42 ± 21*†</b> ; 19% (* 0.001; †<0.0001)	23 ± 11; 15% (* 0.06)
	AS	92 ± 27; 53%	113 ± 47†; 50% (* 0.2; †0.04)	89 ± 43; 56% (* 0.8)
Isolated NNS frequency (.h <sup>-1</sup> )	W	49 ± 14; 36%	<b>68 ± 29*†</b> ; 37% (* 0.02; †0.0009)	42 ± 17; 33% (* 0.4)
	QS	29 ± 10; 21%	<b>39 ± 20*†</b> ; 21% (* 0.004; †<0.0001)	<b>22 ± 10*</b> ; 17% (* 0.03)
	AS	60 ± 26; 43%	78 ± 27; 42% (* 0.1; †0.09)	63 ± 32; 50% (* 0.7)
Frequency of NNS bursts (.h <sup>-1</sup> )	W	4 ± 4; 11%	7 ± 5†; 16% (* 0.1; †0.0009)	3 ± 3; 10% (* 0.6)
	QS	1 ± 1; 3%	<b>2 ± 2*</b> ; 5% (* 0.02; †0.6)	2 ± 1; 6% (* 0.07)
	AS	32 ± 16; 86%	35 ± 34; 80% (* 0.8; †0.3)	26 ± 33; 84% (* 0.6)

Wakefulness (**W**), Quiet Sleep (**QS**), Active Sleep (**AS**), Hypercapnia (**Hc**) and Hypoxia (**Hx**). Results are presented both as mean ± SD, with p values as follows \* vs. air; † vs. hypoxia. Statistically significant values are indicated in bold. In addition, all results are presented as percentage of all NNS (total, isolated or burst) observed in each gas condition.

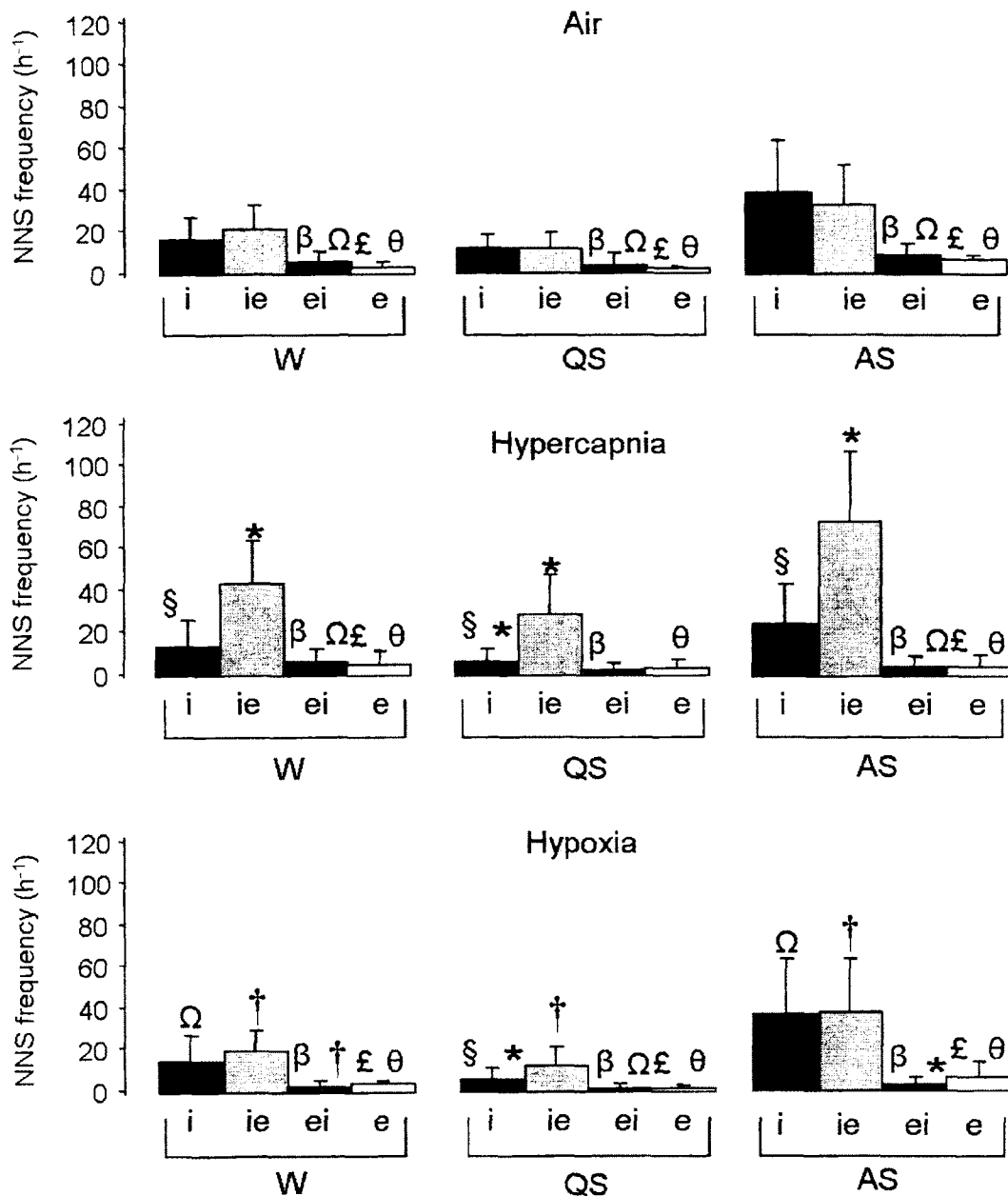


**Figure 3:** Effects of the states of alertness on the frequency of (A) total non-nutritive swallowing (NNS), (B) isolated NNS and (C) NNS bursts in air (white bars), hypercapnia (black bars) and hypoxia (gray bars). **W:** Wakefulness; **QS:** Quiet Sleep; **AS:** Active Sleep. \*:  $p < 0.05$  ( $n = 6$ ).

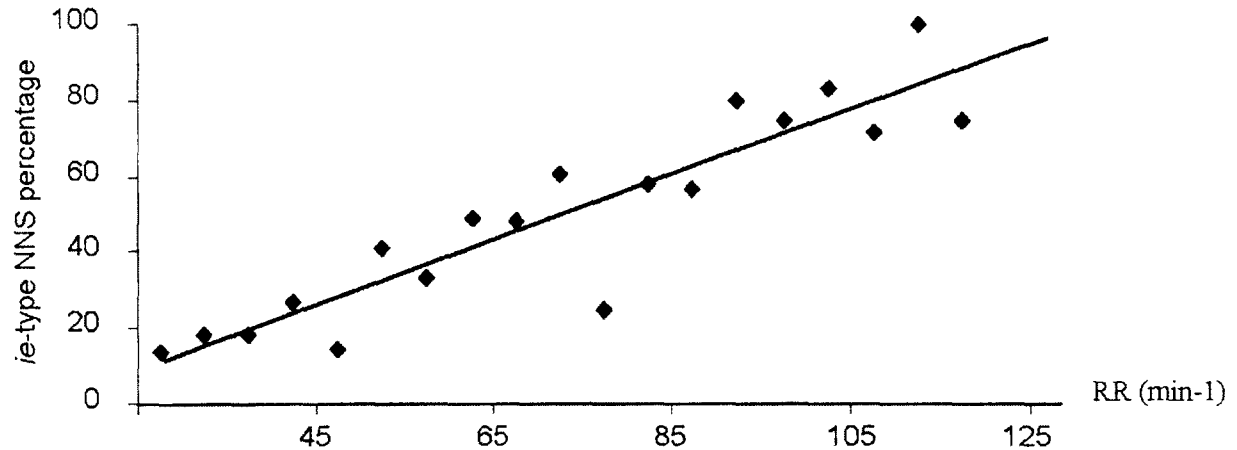
**Table 4: Coordination between NNS and respiration in air, and in hypercapnic and hypoxic conditions (n = 9)**

		W	QS	AS
Air	i-type	17 ± 10	11 ± 7	39 ± 25
	ie-type	22 ± 12 β	11 ± 8 β	33 ± 19 β
	ei-type	6 ± 5 Ω	4 ± 5 Ω	9 ± 6 Ω
	e-type	3 ± 2 £ θ	2 ± 1 £ θ	6 ± 3 £ θ
Hypercapnia	i-type	14 ± 12 § (* 0.4; † 0.6)	6 ± 6* § (* 0.03; † 0.8)	25 ± 18 § (* 0.05; † 0.09)
	ie-type	44 ± 20* † β (* < 0.0001; † < 0.0001)	29 ± 19* † β (* < 0.0001; † < 0.0001)	73 ± 34* † β (* 0.001; † < 0.0001)
	ei-type	7 ± 7 † Ω (* 0.4; † 0.04)	3 ± 4 (* 0.6; † 0.2)	5 ± 5 Ω (* 0.05; † 0.6)
	e-type	5 ± 7 £ θ (* 0.4; † 0.7)	3 ± 5 θ (* 0.3; † 0.4)	4 ± 6 £ θ (* 0.2; † 0.1)
Hypoxia	i-type	15 ± 12 (* 0.6)	6 ± 6* § (* 0.003)	37 ± 26 (* 0.7)
	ie-type	20 ± 10 β (* 0.6)	13 ± 9 β (* 0.4)	37 ± 26 β (* 0.6)
	ei-type	3 ± 3* Ω (* 0.06)	2 ± 2 Ω (* 0.1)	3 ± 4* Ω (* 0.007)
	e-type	4 ± 2 £ θ (* 0.4)	2 ± 2 £ θ (* 0.6)	6 ± 8 £ θ (* 0.9)

Results are presented as mean ± SD. Wakefulness (**W**), Quiet Sleep (**QS**), Active Sleep (**AS**). £: p < 0.05, *i*-type vs. *e*-type; §: p < 0.05, *i*-type vs. *ie*-type; Ω: p < 0.05, *i*-type vs. *ei*-type; β: p < 0.05, *ie*-type vs. *ei*-type; θ: p < 0.05, *ie*-type vs. *e*-type; &: p < 0.05, *ei*-type vs. *e*-type. \*: p < 0.05 vs. air; †: p < 0.05 hypoxia vs. hypercapnia.



**Figure 4:** Effects of hypercapnia and hypoxia on NNS-breathing coordination. Abbreviations: *i*-type NNS, NNS beginning and ending in inspiration; *e*-type NNS, NNS beginning and ending in expiration; *ie*-type NNS, NNS beginning in inspiration and ending in expiration; *ei*-type NNS, NNS beginning in expiration and ending in inspiration. **W:** Wakefulness; **QS:** Quiet Sleep; **AS:** Active Sleep; **ε:**  $p < 0.05$ , *i*-type vs. *e*-type; **§:**  $p < 0.05$ , *i*-type vs. *ie*-type; **Ω:**  $p < 0.05$ , *i*-type vs. *ei*-type; **β:**  $p < 0.05$ , *ie*-type vs. *ei*-type; **θ:**  $p < 0.05$ , *ie*-type vs. *e*-type, **&**:  $p < 0.05$ , *ei*-type vs. *e*-type; **\***:  $p < 0.05$ , Hypercapnia vs. Normoxia or Hypoxia vs. Normoxia; **†:**  $p < 0.05$  Hypoxia vs. Hypercapnia ( $n = 9$ ).



**Figure 5:** Correlation between respiratory rate and the percentage of *ie*-type NNS during air breathing. **RR:** Respiratory Rate. For each NNS, RR was measured from the 3 preceding breaths and *ie*-type NNS percentage was calculated for each interval of five breaths (20-24; 25-29; 30-34... min<sup>-1</sup>) (n = 6).

### **Respiratory timing and ventilatory resetting before, during and after non-nutritive swallowing**

Results on respiratory timing of the *n*-1 and *n*+1 breaths are reported in figure 6. Differences were considered physiologically significant upon reaching at least 20% higher than control values. Overall, regardless of NNS type, inspiratory gas condition or state of alertness, swallowing did not alter respiratory timing for the *n*-1 breath. Similar observations were made for the *n*+1 breath, with the exception of *ei*-type NNS, which were often associated with moderate increases in *T<sub>i</sub>* and *T<sub>tot</sub>*. Conversely, respiratory timing of the breath where NNS occurred (*n* breath) was largely altered, depending on the NNS type. The following alterations were consistent, regardless of inspiratory gas condition and state of alertness, with a few exceptions in AS. While *i*-type NNS was associated with an increase in *T<sub>i</sub>*, *T<sub>tot</sub>* and *T<sub>i</sub>/T<sub>tot</sub>*, *ie*-type NNS was associated with an increase in *T<sub>i</sub>*, *T<sub>e</sub>* and *T<sub>tot</sub>*, whereas *e*-type NNS was associated with an increase in *T<sub>e</sub>* and *T<sub>tot</sub>* and a decrease in *T<sub>i</sub>/T<sub>tot</sub>*. Finally, alterations of respiratory timing with *ei*-type NNS were highly

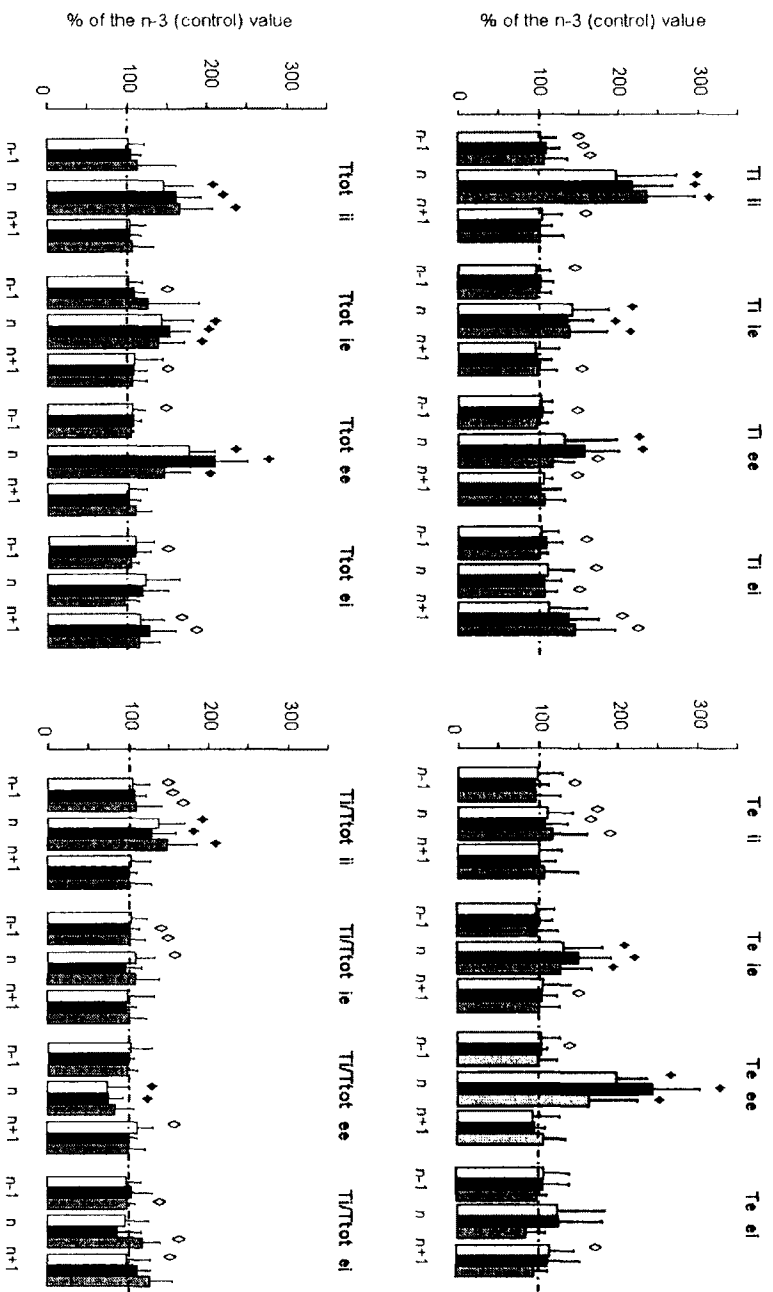
variable. Neither Hc nor Hx modified alterations in respiratory timing by NNS for the  $n$ ,  $n-1$  and  $n+1$  breaths.

### **Time course of the measured variables during the recordings**

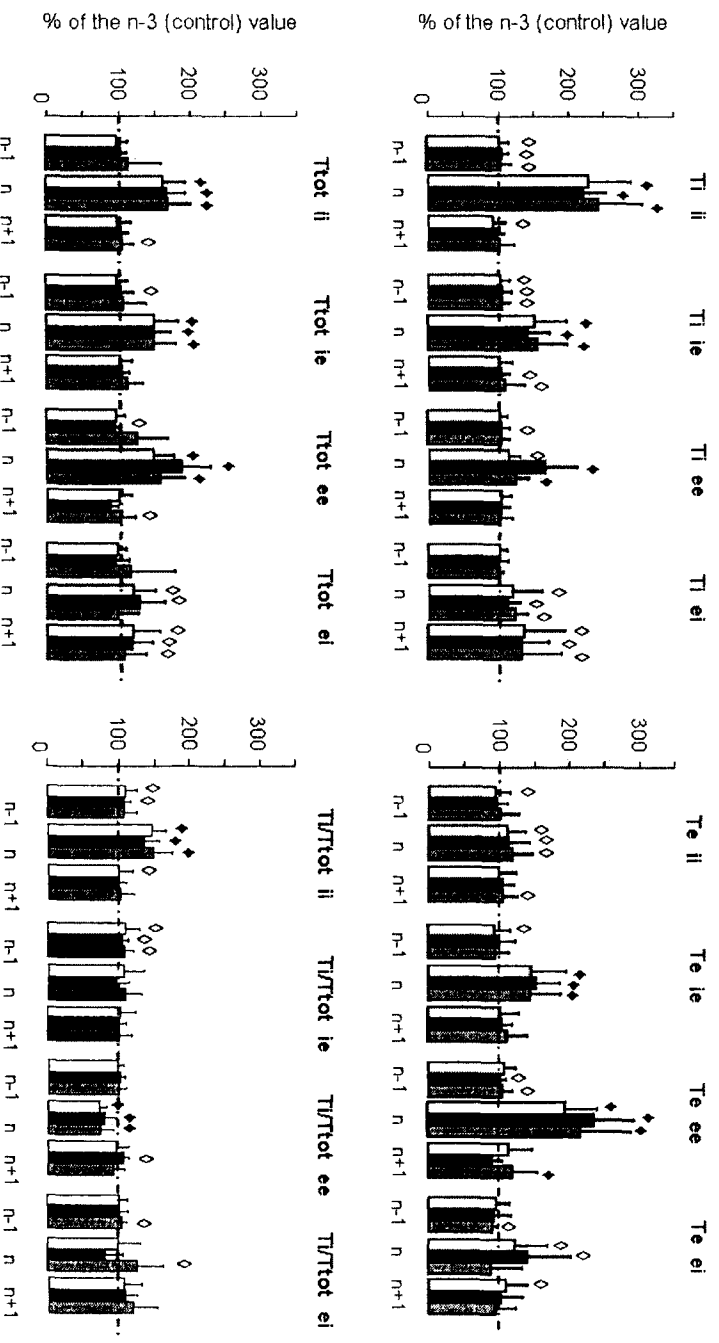
Blood gases were constant throughout the recordings (Air:  $\text{PaO}_2 = 86 \pm 21$  and  $82 \pm 15$  mmHg,  $\text{PaCO}_2 = 38 \pm 0$  and  $38 \pm 2$  mmHg,  $\text{pH} = 7.47 \pm 0.01$  and  $7.47 \pm 0.002$ ; Hc:  $\text{PaO}_2 = 105 \pm 1$  and  $99 \pm 1$  mmHg,  $\text{PaCO}_2 = 44 \pm 0$  and  $43 \pm 3$  mmHg,  $\text{pH} = 7.40 \pm 0.01$  and  $7.44 \pm 0.04$ ; Hx:  $\text{PaO}_2 = 26 \pm 4$  and  $26 \pm 4$  mmHg,  $\text{PaCO}_2 = 25 \pm 0$  and  $28 \pm 1$  mmHg,  $\text{pH} = 7.57 \pm 0.01$  and  $7.55 \pm 0.00$ ; respectively in the first and last hour of the recordings). Also, total NNS frequency was identical in the first and last hour of the recordings in W and QS in both Hc (W:  $78 \pm 46$  and  $75 \pm 43$   $\text{min}^{-1}$ , QS:  $47 \pm 40$  and  $39 \pm 18$   $\text{min}^{-1}$ ;  $p > 0.4$ ) and Hx (W:  $44 \pm 23$  and  $55 \pm 29$ , QS:  $20 \pm 16$  and  $26 \pm 12$   $\text{min}^{-1}$ ;  $p > 0.09$ ). Furthermore, no significant difference was observed for respiratory rate and sigh frequency between the first and the last hour of the recordings in both Hc and Hx ( $p > 0.1$ ). In contrast with Hc ( $p > 0.05$ ), a decrease in apnea frequency between the first and last hour of the recordings was observed in W and QS ( $p < 0.03$ ) during Hx. Finally, a decrease in heart rate was consistently observed between the first and last hour of the recordings in W and QS in Hx ( $p < 0.0001$ ) and only during QS in Hc ( $p = 0.004$ ).



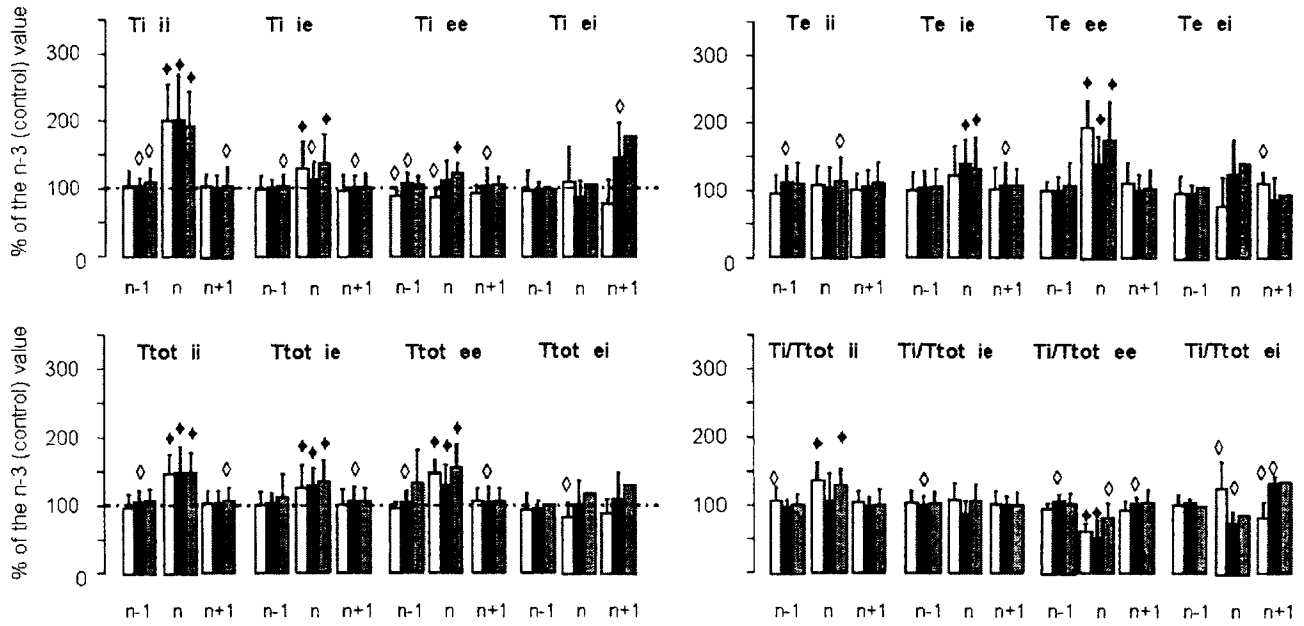
### -A- Quiet Wakefulness



### -B- Quiet Sleep



### -C- Active Sleep



**Figure 6:** Influence of *ii*, *ie*, *ee* and *ei*-type NNS during hypoxia and hypercapnia on respiratory timing parameters in the breath before (n-1), during (n) and after (n+1) the NNS. From top to bottom, results are presented for quiet wakefulness, quiet sleep and active sleep. **W:** Wakefulness; **QS:** Quiet Sleep; **AS:** Active Sleep; **Ti:** inspiratory time; **Te:** expiratory time; **Ttot:** total duration of the breathing cycle; **Ti/Ttot:** duty cycle. **White:** Normoxia; **Black:** Hypercapnia; **Gray:** Hypoxia. All values are expressed as the percentage of the value obtained for the n-3 breath (= control value) and averaged for the entire group. Open symbols indicate significantly different values from controls. Closed symbols indicate differences, which are over 20% from control values (n = 6).

## **DISCUSSION**

The present study provides new insight into the differential effect of moderate hypercapnia or hypoxia on non-nutritive swallowing in the neonatal period. Hypercapnia was found to increase overall NNS frequency, due to a specific increase in *ie*-type NNS, regardless of the state of alertness. In contrast, hypoxia tended to decrease overall NNS frequency, with no effect on specific NNS-types. Furthermore, neither hypercapnia nor hypoxia altered the respiratory timing of the breath where NNS occurred or that of the preceding or subsequent breath. To our knowledge, this is the first study assessing the effect of hypoxia and hypercapnia on spontaneous NNS, including on NNS-breathing coordination.

### **Sleep architecture during moderate hypercapnia or hypoxia**

***Hypoxia and states of alertness.*** Results from the present study show an increase in the time spent in QS during Hx, with no changes in W or AS duration. These results are in general agreement with previous results in the perinatal period, showing longer epochs of QS in hypoxic kittens (2), and a decrease in the time spent in AS in hypoxic (anemia) fetal lambs (17). In addition, a recent study in adult humans showed that acute Hx increased total sleep time (12), which led the authors to suggest that accumulation of GABA released by hypothalamic ventrolateral preoptic neurons in Hx directly inhibits wake-promoting regions of the brainstem. Accordingly, Hx would promote and reinforce the sleep side of the hypothalamic sleep switch (39). Conversely, an increase in the time spent in W was reported in adult rats (21, 28, 37). Overall, discrepancies between studies may be related to the experimental design, or to differences in species and/or maturation, the latter being in accordance with the concept of an enhanced hypoxic hypo-metabolism and inactivity/energy conservation as a protective response in the neonatal period (22).

***Hypercapnia and states of alertness.*** While earlier studies in adult rats suggested that Hc had no influence on sleep-wakefulness architecture (21, 37), our observation of an increase in the time spent in W is more consistent with the

known stimulating effect of Hc on several chemosensitive neuronal populations known for stimulating W. These populations include noradrenergic neurons in the locus coeruleus and the paraventricular hypothalamic nucleus, serotonergic raphe neurons, histaminergic neurons in the tuberomammillary nucleus and orexin/hypocretin in the hypothalamus (6, 9, 11, 24).

### **Cardiorespiratory effects of moderate hypercapnia or hypoxia**

***Respiratory effects of hypercapnia and hypoxia.*** Hypercapnia is a potent respiratory stimulus throughout life, including in the fetal sheep (14) and the newborn lamb from the very first hours after birth (31). The present results confirm that Hc increases respiratory rate in all three states of alertness, with a tendency to be less marked in AS, as previously reported in the newborn infant (7). Moreover, the increase in respiratory rate observed during Hx in the present study, regardless of the state of alertness, complements previous results in newborn lambs during W (5, 42). Both Hc and Hx have also been shown to increase respiratory rate in adult rats, regardless of sleep state (21). However, differences were reported in the amplitude of the increase in respiratory rate between QS and W in adult rats during Hx (28), whereas respiratory rate did not increase in adult dogs during Hx (30). Again, explanation for these discrepancies may be related to species differences and/or in the experimental design.

Given that most apneas in the newborn lamb are post-sigh apneas, the decreased frequency of apneas in W and AS during Hc, comparatively to both air and Hx, appears to be mainly related to the simultaneous decrease in sigh frequency (see table 1). A Hc-related decrease in the sensitivity of the Hering-Breuer reflex, which is likely responsible for the post-sigh apneas, is not supported by previous data in newborn rats (19).

***Effect of hypercapnia and hypoxia on heart rate.*** In agreement with the present results, both Hc and Hx have been previously reported to cause tachycardia during W in newborn lambs (16, 41). However, we are not aware of any previous data on the alteration of heart rate in Hc or Hx during sleep in newborn mammals. According to the present results, while heart rate was also increased in QS during

Hc or Hx, relative to W, this increase in heart rate was abolished during AS. Unfortunately, the design of our study does not provide any clues as to the reasons for this AS effect.

### **Effects of hypercapnia or hypoxia on NNS frequency**

***Increase in NNS frequency with hypercapnia.*** Results from the present study show that Hc significantly increased NNS frequency during W and sleep. The reasons for this novel observation could be explained by one or several of the following mechanisms. First, an increase in salivary flow has been reported under high levels of Hc ( $\text{FiCO}_2 = 0.16$ ) (13) thus contributing to the elimination of  $\text{CO}_2$  via bicarbonate production in saliva (20) and evaporation. However, measurement of salivary flow in the present study (3 lambs) does not support the involvement of this particular mechanism (Air :  $0.14 \pm 0.06 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Hc :  $0.14 \pm 0.04 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Secondly, 5 to 10%  $\text{CO}_2$  has been shown to stimulate the activity of most laryngeal mechanoreceptors, probably including those involved in the swallowing reflex (1, 3, 4). Thirdly, hypercapnia may stimulate activity of the swallowing central pattern generator (CPG). Interestingly, neurons of the swallowing CPG are co-localized with neurons of the respiratory CPG in the medulla, including in the nucleus tractus solitarius (NTS) and in proximity of the nucleus ambiguus (15). Moreover, previous studies suggest that swallowing and respiration CPG are incompletely separated in newborn animals (43, 44). According to our hypothesis, Hc could thus simultaneously activate neurons of the respiratory and swallowing CPG through afferent messages originating from both the peripheral arterial chemoreceptors and various chemoreceptor sites in the brainstem. In addition, neurons of the swallowing CPG could also be directly activated by  $\text{CO}_2$ , as previously shown for respiratory neurons contained in the NTS (23).

The only two known prior studies on the effects of Hc on swallowing have yielded conflicting results. Indeed, Hc was reported to have no effect on the swallowing reflex triggered by electrical stimulation of the superior laryngeal nerve in anesthetized, ventilated and bivatogomized cats (26). On the contrary, Hc was

later reported to decrease the frequency of water-induced swallowing in conscious adult humans (25). While differences in swallowing responses to CO<sub>2</sub> between adult humans or cats and newborn lambs may be related to differences in species and/or neural immaturity, important differences in experimental conditions are also likely involved, at least partially.

***Absence of effect of hypoxia on NNS frequency.*** In contrast to Hc, Hx did not significantly alter NNS frequency, regardless of the state of alertness, despite a significant increase in respiratory rate (though less marked than with Hc). In fact, Hx tended to decrease NNS frequency, which is in agreement with the decrease in swallowing frequency previously reported in anesthetized, bivagotomized cats under mechanical ventilation (26). Presence of anesthesia in the latter study may have enhanced the effect of Hx on swallowing activity. The reasons for the decrease in swallowing during Hx are unclear. First, a decrease in saliva production in Hx is not supported by our current measurements (3 lambs) (air :  $0.14 \pm 0.06$  g.min<sup>-1</sup>; Hx :  $0.12 \pm 0.02$  g.min<sup>-1</sup>). Secondly, while Hx could be hypothesized to inhibit the activity of the co-localized swallowing and respiratory CPGs, as reported for the hypoxic respiratory response in the newborn, this is also not supported by our results which show a significant increase in respiratory rate in Hx, compared to air. Thirdly, the absence of an increase in NNS frequency in Hx, despite a significant increase in respiratory rate, may be related to the presence of hypocapnia in Hx (air:  $40 \pm 1$  mmHg; Hc:  $50 \pm 1$  mmHg; Hx:  $30 \pm 2$  mmHg), which would specifically act on the swallowing reflex *via* an unknown mechanism. Finally, the decrease in swallowing activity could be part of the more general decrease in respiratory protecting reflexes, such as cough, previously reported in hypoxia (8, 45). Indeed, this may be linked to hypoxic hypometabolism, as measured in 3 lambs of the present study.

### **Coordination between non-nutritive swallowing and respiration**

The preponderance of inspiratory NNS versus expiratory NNS observed in room air breathing in the present study, irrespective of the state of alertness, is in agreement with our previous studies in newborn lambs (34, 38). These results are

at variance however with previous reports on NNS-breathing coordination showing both a preponderance of e-type NNS in room air breathing (25). Such differences with our present results in lambs are not uniquely related to age, since NNS-respiration coordination in room air breathing in adult sheep and goats is identical to that observed in lambs (10, 36). Important differences in experimental conditions, *i.e.*, study of water-induced swallowing in adult humans vs. spontaneously occurring NNS in the newborn and adult sheep and in goats, may be part of the explanation. In addition, species differences, including body position (sitting vs. on all their fours or lying prone) are also potential causes.

The consistent, specific increase in *ie*-type NNS frequency in all three states of alertness during Hc is at variance with the only previous report in awake adult humans showing a complex alteration of NNS-breathing coordination in Hc, including an increase in both *i*-type and *ei*-type swallowing, and a decrease in *e*-type swallowing (25). However, the specific increase in *ie*-type NNS in Hc in the present study is in partial agreement with previous results in adult humans showing that hyperventilation (without Hc) modifies NNS-breathing coordination by increasing *e*-type NNS and *ie*-type NNS (40). Additional support to the hypothesis that hyperventilation per se is linked to an increase in *ie*-type NNS is provided by the observation in the present study of a linear, highly significant relationship between respiratory rate and *ie*-type NNS frequency during air breathing. However, the absence of an overall increase in *ie*-type NNS percentage in Hx, despite significant hyperventilation, indicates that the effects of hyperventilation can be blunted by other influences such as hypocapnia.

Finally, the present observations that, overall, NNS modifies respiratory timing of the NNS-breath only, with no ventilatory resetting in the following breath, especially for *ie*-type NNS in Hc, indicates an absence of ventilatory resetting in newborn lambs, regardless of state of alertness or surrounding gas condition. These results are in agreement with previous identical data obtained in human infants during room air breathing (46). Previous data in adult mammals during room air breathing are controversial, showing the presence a ventilatory resetting only after *e*-type NNS (very rare NNS type in our study) in goats (10) or after all

NNS-types (29), or a total absence of ventilatory resetting, regardless of NNS-type (27). These controversies are unexplained. To our knowledge, the present observations that Hc and Hx do not lead to ventilatory resetting after NNS are unique.

### **Clinical relevance**

It is unclear whether the increased NNS frequency during Hc has beneficial or deleterious effects during the neonatal period. For example, an increase in NNS frequency could reduce aspiration of pharyngeal refluxes. However, if they occur during AS, they can lead to obstructive apnea in preterm lambs (33). In addition, the long-term effect of increasing NNS during prolonged Hc in the neonatal period on swallowing maturation is unknown, and the present results question the increased use of permissive hypercapnia in neonatal units after an extubation, when PaO<sub>2</sub> is restored.

### **Conclusion**

We conclude that contrarily to hypoxia, hypercapnia stimulates NNS. This increase in NNS is observed in all three states of alertness and is specific to the *ie*-type NNS. These results lead to testable hypotheses in our ovine model regarding the mechanisms involved and potential consequences, including on the risk of aspirations and on postnatal maturation of swallowing.



## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors wish to gratefully acknowledge the technical assistance of Jean-Philippe Gagné, and Marie-Pierre Garant for statistical help. The experiments were supported by the Canadian Institutes of Health Research (MOP 15558) and the Foundation for Research into Children's diseases (Quebec). Jean-Paul Praud is a national scholar of the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec*, and a member of the *Centre de recherche clinique Étienne Le Bel du CHU de Sherbrooke*.

## REFERENCES

1. **Anderson JW, Sant'Ambrogio FB, Orani GP, Sant'Ambrogio G and Mathew OP.** Carbon dioxide-responsive laryngeal receptors in the dog. *Respir.Physiol.* 82: 217-226, 1990.
2. **Baker TL and McGinty DJ.** Sleep-waking patterns in hypoxic kittens. *Dev.Psychobiol.* 12: 561-575, 1979.
3. **Boushey HA, Richardson PS, Widdicombe JG and Wise JC.** The response of laryngeal afferent fibres to mechanical and chemical stimuli. *J.Physiol.* 240: 153-175, 1974.
4. **Bradford A, McKeogh D and O'Regan RG.** Laryngeal-receptor responses to phasic CO<sub>2</sub> in anesthetized cats. *J.Appl.Physiol.* 85: 1135-1141, 1998.
5. **Bureau MA, Zinman R, Foulon P and Begin R.** Diphasic ventilatory response to hypoxia in newborn lambs. *J.Appl.Physiol.* 56: 84-90, 1984.
6. **Coates EL, Li A and Nattie EE.** Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. *J.Appl.Physiol.* 75: 5-14, 1993.
7. **Cohen G, Xu C and Henderson-Smart D.** Ventilatory response of the sleeping newborn to CO<sub>2</sub> during normoxic rebreathing. *J.Appl.Physiol.* 71: 168-174, 1991.
8. **Eckert DJ, Catcheside PG, Stadler DL, McDonald R, Hlavac MC and McEvoy RD.** Acute sustained hypoxia suppresses the cough reflex in healthy subjects. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 173: 506-511, 2006.
9. **Espana RA and Scammell TE.** Sleep neurobiology for the clinician. *Sleep* 27: 811-820, 2004.
10. **Feroah TR, Forster HV, Fuentes CG, Lang IM, Beste D, Martino P, Pan L and Rice T.** Effects of spontaneous swallows on breathing in awake goats. *J.Appl.Physiol.* 92: 1923-1935, 2002.
11. **Haxhiu MA, Tolentino-Silva F, Pete G, Kc P and Mack SO.** Monoaminergic neurons, chemosensation and arousal. *Respir.Physiol.* 129: 191-209, 2001.
12. **Hlavac MC, Catcheside PG, McDonald R, Eckert DJ, Windler S and McEvoy RD.** Hypoxia impairs the arousal response to external resistive loading and airway occlusion during sleep. *Sleep* 29: 624-631, 2006.
13. **Hoover WH, Sawyer MS and Apgar WP.** Ovine nutritional responses to elevated ambient carbon dioxide. *J.Nutr.* 101: 1595-1600, 1971.
14. **Jansen AH, Ioffe S, Russell BJ and Chernick V.** Influence of sleep state on the response to hypercapnia in fetal lambs. *Respir.Physiol.* 48: 125-142, 1982.

15. **Jean A.** Brain stem control of swallowing: neuronal network and cellular mechanisms. *Physiol.Rev.* 81: 929-969, 2001.
16. **Koivikko A.** Cardiovascular response of the neonatal lamb to hypoxia, hypercapnia and metabolic acidosis. *Acta Paediatr.Scand.* :Suppl 191: 1969.
17. **Koos BJ, Sameshima H and Power GG.** Fetal breathing, sleep state, and cardiovascular responses to graded anemia in sheep. *J.Appl.Physiol.* 63: 1463-1468, 1987.
18. **Letourneau P and Praud J- P.** A radiotelemetry system for polysomnographic recordings in lambs. *Methods* 30: 115-121, 2003.
19. **Matsuoka T and Mortola JP.** Effects of hypoxia and hypercapnia on the Hering-Breuer reflex of the conscious newborn rat. *J.Appl.Physiol.* 78: 5-11, 1995.
20. **McClanahan HH and Amberson WR.** bicarbonate elimination through the salivary glands under nervous and chemical stimulation. 53: 189-197, 1935.
21. **Megirian D, Ryan AT and Sherrey JH.** An electrophysiological analysis of sleep and respiration of rats breathing different gas mixtures: diaphragmatic muscle function. *Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol.* 50: 303-313, 1980.
22. **Mortola JP and Dotta A.** Effects of hypoxia and ambient temperature on gaseous metabolism of newborn rats. *Am.J.Physiol.* 263: R267-72, 1992.
23. **Nattie EE and Li A.** CO<sub>2</sub> dialysis in nucleus tractus solitarius region of rat increases ventilation in sleep and wakefulness. *J.Appl.Physiol.* 92: 2119-2130, 2002.
24. **Nattie EE and Li A.** CO<sub>2</sub> dialysis in the medullary raphe of the rat increases ventilation in sleep. *J.Appl.Physiol.* 90: 1247-1257, 2001.
25. **Nishino T, Hasegawa R, Ide T and Isono S.** Hypercapnia enhances the development of coughing during continuous infusion of water into the pharynx. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 157: 815-821, 1998.
26. **Nishino T, Kohchi T, Honda Y, Shirahata M and Yonezawa T.** Differences in the effects of hypercapnia and hypoxia on the swallowing reflex in cats. *Br.J.Anaesth.* 58: 903-908, 1986.
27. **Nishino T, Yonezawa T and Honda Y.** Effects of swallowing on the pattern of continuous respiration in human adults. *Am.Rev.Respir.Dis.* 132: 1219-1222, 1985.
28. **Pappenheimer JR.** Sleep and respiration of rats during hypoxia [proceedings]. *J.Physiol.* 263: 149P-150P, 1976.

29. **Paydarfar D, Gilbert RJ, Poppel CS and Nassab PF.** Respiratory phase resetting and airflow changes induced by swallowing in humans. *J.Physiol.* 483: 273-288, 1995.
30. **Phillipson EA, Sullivan CE, Read DJ, Murphy E and Kozar LF.** Ventilatory and waking responses to hypoxia in sleeping dogs. *J.Appl.Physiol.* 44: 512-520, 1978.
31. **Praud J-P, Diaz V, Kianicka I, Chevalier JY, Canet E and Thisdale Y.** Abolition of breathing rhythmicity in lambs by CO<sub>2</sub> unloading in the first hours of life. *Respir.Physiol.* 110: 1-8, 1997.
32. **Reix P, Arsenault J, Dome V, Fortier PH, Lafond JR, Moreau-Bussiere F, Dorion D and Praud J-P.** Active glottal closure during central apneas limits oxygen desaturation in premature lambs. *J.Appl.Physiol.* 94: 1949-1954, 2003.
33. **Reix P, Arsenault J, Langlois C, Niyonsenga T and Praud J-P.** Nonnutritive swallowing and respiration relationships in preterm lambs. *J.Appl.Physiol.* 97: 1283-1290, 2004.
34. **Reix P, Fortier PH, Niyonsenga T, Arsenault J, Letourneau P and Praud J-P.** Non-nutritive swallowing and respiration coordination in full-term newborn lambs. *Respir.Physiol.Neurobiol.* 134: 209-218, 2003.
35. **Renolleau S, Letourneau P, Niyonsenga T, Praud J-P and Gagne B.** Thyroarytenoid muscle electrical activity during spontaneous apneas in preterm lambs. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 159: 1396-1404, 1999.
36. **Roberge S, Samson N, Dorion S, St-Hilaire M, Dorion D and Praud J-P.** Non-nutritive swallowing and respiration in adult sheep. *J.Otolaryngol.* in press.
37. **Ryan AT and Megirian D.** Sleep-wake patterns of intact and carotid sinus nerve sectioned rats during hypoxia. *Sleep* 5: 1-10, 1982.
38. **Samson N, St-Hilaire M, Nsegbe E, Reix P, Moreau-Bussiere F and Praud J-P.** Effect of nasal continuous or intermittent positive airway pressure on nonnutritive swallowing in the newborn lamb. *J.Appl.Physiol.* 99: 1636-1642, 2005.
39. **Saper CB, Chou TC and Scammell TE.** The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci.* 24: 726-731, 2001.
40. **Shaker R, Li Q, Ren J, Townsend WF, Dodds WJ, Martin BJ, Kern MK and Rynders A.** Coordination of deglutition and phases of respiration: effect of aging, tachypnea, bolus volume, and chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Physiol.* 263: G750-5, 1992.

41. **Sidi D, Kuipers JR, Teitel D, Heymann MA and Rudolph AM.** Developmental changes in oxygenation and circulatory responses to hypoxemia in lambs. *Am.J.Physiol.* 245: H674-82, 1983.
42. **Stahlman M, Gray J, Young WC and Shepard FM.** Cardiovascular response of the neonatal lamb to hypoxia and hypercapnia. *Am.J.Physiol.* 213: 899-904, 1967.
43. **Sumi T.** coordination of neural organization of respiration and deglutition: its change with postnatal maturation. In: *development of upper respiratory anatomy and function*, edited by Bosma JS,J.1975, p. 145-159.
44. **Sumi T.** The nature and postnatal development of reflex deglutition in the kitten. *Jpn.J.Physiol.* 17: 200-210, 1967.
45. **Widdicombe J and Singh V.** Physiological and pathophysiological down-regulation of cough. *Respir.Physiol.Neurobiol.* 150: 105-117, 2006.
46. **Wilson SL, Thach BT, Brouillette RT and Abu-Osba YK.** Coordination of breathing and swallowing in human infants. *J.Appl.Physiol.* 50: 851-858, 1981.

Article 2:

**VALIDATION OF A NEW AUTOMATIC SMOKING MACHINE TO STUDY THE EFFECTS OF CIGARETTE SMOKE IN NEWBORN LAMBS.**

Duvarille C, Beaudry B, St-Hilaire M, Boheimier M, Brunel C, Micheau P, Praud J-P.

Publié dans *Laboratory Animals* 2010 ; 44 (4) ; 290-297.

Résumé : L'exposition à la fumée secondaire de cigarette est devenue depuis la campagne « Dodo sur le dos » la première cause réversible du SMSN. Le but de cette étude est de construire, développer et valider au sein de notre laboratoire un système d'exposition à la fumée secondaire appelé machine à fumer automatique pour l'étude des effets de la fumée secondaire chez des animaux de différentes tailles incluant les gros mammifères. L'équipement inclut une machine à fumer programmable connectée à une chambre d'exposition où les animaux sont exposés à la fumée secondaire dite *mainstream and sidestream*. Une interface facile d'utilisation permet de programmer le volume d'une bouffée (1-60 ml), le temps entre deux bouffées (1-60 sec) et entre deux cigarettes (1-60 min).

Matériel et Méthodes : 12 agneaux nouveau-nés ont été exposés à dix (4 agneaux, groupe C10) ou 20 cigarettes (4 agneaux, groupe C20), 8 heures par jour durant 15 jours en utilisant la machine à fumer développée dans notre laboratoire. Quatre agneaux contrôles supplémentaires ont été exposés à l'air (groupe C0). Au douzième jour, chaque agneau a été instrumenté de façon chronique sous anesthésie générale pour l'enregistrement d'un électrocardiogramme, des mouvements oculaires, d'un électro-corticogramme, du flux nasal et de l'activité des muscles thyroaryténoïdiens (constricteurs de la glotte) par télémétrie. Des enregistrements polysomnographiques ont été effectués chez les agneaux nouveau-nés sans sédation ni contention ayant été exposés ou non à la fumée secondaire de cigarette. Les marqueurs d'expositions (Cotinine urinaire, inflammation laryngée) ainsi que les marqueurs de bien-être (prise de poids, signes vitaux) ont aussi été évalués.

Résultats : le gain de poids est identique entre les trois modes d'exposition. Le rapport cotinine/créatinine urinaire augmente avec l'intensité de l'exposition (C0:  $11 \pm 7 \text{ ng.mg}^{-1}$ ; C10:  $961 \pm 539 \text{ ng.mg}^{-1}$ ; C20:  $1821 \pm 312 \text{ ng.mg}^{-1}$ ) ; ces valeurs correspondent à celles publiées chez les enfants exposés à la fumée secondaire.

Conclusion: les résultats de cette étude de validation montrent que la machine à fumer automatique construite par notre laboratoire est très performante pour l'étude des effets de la fumée secondaire chez les gros animaux non anesthésiés et non contentionnés comme le mouton et reproduit complètement tous les aspects de la fumée secondaire.

Contributions :

Pour cet article, j'ai réalisé toutes les étapes menant à sa rédaction allant de la mise au point de la fabrication de la machine à fumer en collaboration avec l'équipe d'ingénieurs jusqu'à la rédaction de cet article, en passant par la mise au point du plan expérimental pour la validation de la machine à fumer et l'analyse des résultats, le tout étant supervisé par mon directeur de recherche Dr Praud.

Marie St-Hilaire et Mahieu Boheimier ont contribué à la validation de la machine à fumer via l'expérimentation sur les animaux nécessaires à ce projet. Quant à Benoit Beaudry, Cyril Brunel et Philippe Micheau, ils sont les principaux acteurs de la mise en place et de la construction de la machine à fumer automatique sur le plan purement mécanique.

# VALIDATION OF A NEW AUTOMATIC SMOKING MACHINE TO STUDY THE EFFECTS OF CIGARETTE SMOKE IN NEWBORN LAMBS

**Charles Duvareille<sup>1</sup>, Benoit Beaudry<sup>2</sup>, Marie St-Hilaire<sup>1</sup>, Mathieu Boheimier<sup>1</sup>,  
Cyril Brunel<sup>2</sup>, Philippe Micheau<sup>2</sup>, Jean-Paul Praud<sup>1</sup>**

1. Neonatal Respiratory Research Unit, Departments of Pediatrics and Physiology
  2. Department of Mechanical Engineering
- Université de Sherbrooke

Running title: Automatic smoking machine for newborn lambs

Address for correspondence

Jean-Paul Praud MD PhD  
Departments of Pediatrics and Physiology  
Université de Sherbrooke  
J1H 5N4 - QC – Canada  
Email: [Jean-Paul.Praud@USherbrooke.ca](mailto:Jean-Paul.Praud@USherbrooke.ca)  
Fax: 1 (819) 564-5215  
Phone: 1 (819) 346-1110, ext 14851



**ABSTRACT**

The aim of this study was to describe the characteristics and validate the use of a new, custom-built automatic smoking machine (ASM) primarily designed to study the effects of an environmental tobacco smoke surrogate (ETS surrogate) exposure in animals of various sizes, including large animals. The equipment includes a programmable ASM coupled to a vented whole body chamber, where animals can be exposed to both mainstream and sidestream smoke. The user-friendly interface allows for full programming of puff volume (1-60 ml), time interval between two puffs (1-60 sec) and between two cigarettes (1-60 min). Eight newborn lambs were exposed to either ten (4 lambs, C10 group) or twenty (4 lambs, C20 group) cigarettes, 8 hours per day for 15 days. Four additional control lambs were exposed to air (C0 group). Weight gain was identical in all 3 groups of lambs. Urinary cotinine / creatinine ratio increased with the number of cigarettes smoked (C0:  $11 \pm 7$  ng.mg<sup>-1</sup>; C10:  $961 \pm 539$  ng.mg<sup>-1</sup>; C20:  $1821 \pm 312$  ng.mg<sup>-1</sup>), with levels in the C10 and C20 groups in keeping with values published in infants exposed to ETS. Overall, results show that our new ASM is especially well suited for ETS surrogate exposure in non-restrained, non-anesthetized large animals such as sheep.

**Keywords:** environmental tobacco smoke, mainstream smoke, sidestream smoke, urinary cotinine, lamb.

## **INTRODUCTION**

The early postnatal period is critical due to the immaturity of control centers involved in vital functions such as respiration, cardiovascular function, sleep-wake cycles, thermoregulation and swallowing function. Various innate or acquired factors can disrupt normal development and maturation of these functions, paving the way for frequent pathologies such as apparent life-threatening events of infancy or sudden infant death syndrome (SIDS). Following worldwide campaigns to prevent prone sleeping, perinatal passive exposure to tobacco smoke is now considered to be the single most important cause of preventable death by SIDS (1-7). In fact, it has been calculated that one third of reported SIDS deaths could have been prevented with avoidance of prenatal exposure to tobacco smoke (8). Moreover, postnatal tobacco exposure has been reported to increase SIDS by 2- to 3-fold (9). Finally, infants who died from SIDS tend to have higher concentrations of nicotine in their lungs than controls (10).

Most studies on the effect of environmental tobacco smoke (ETS) exposure in the perinatal period have focused on nicotine alone. However, of the at least 4000 different chemical compounds present in tobacco smoke, more than one hundred are toxic, suggesting that animal studies focusing on nicotine should be complemented by studies on ETS exposure. In addition, studies on ETS must take into account that a burning cigarette produces a combination of mainstream smoke MS (inhaled, then exhaled into the environment by the smoker) and sidestream smoke SS (produced by a passively-burning cigarette). Indeed, it has been previously shown that the relative composition of both types of smoke is different (11, 12).

Various smoking machines have been built for the tobacco industry over the years, with the primary aim of assessing and/or modulating the levels of various compounds in cigarette smoke. With time, smoking machines have refined from a manually-operated system to fully automatic and programmable systems.

However, a significant drawback of such systems designed for testing cigarettes by the industry resides in their complexity.

While several animal studies on the effects of ETS in the perinatal period have also used automatic smoking machines (ASM), few bear significant relevance to sudden infant death syndrome pathogenesis (13). Interestingly, some effects of postnatal exposure alone on brain cell development have been found to be identical to the effects of prenatal added to postnatal exposure in rats and monkeys (13, 14). In recent years, we became especially interested in assessing the effects of early postnatal ETS on cardiorespiratory control in our newborn ovine models. Such models have been used because of the unequalled amount of knowledge on fetal and neonatal cardiorespiratory physiology, the possibility to study preterm lambs and the ability to study numerous cardiorespiratory physiological signals during prolonged polysomnography in unrestrained, unanesthetized, chronically instrumented animals. However, commercially available ASM failed to meet our needs for a programmable, user-friendly and compact system allowing to assess the effects of both SS and (exhaled) MS smoke in freely-moving, large developing animals during several days. We therefore designed and built a new system under close collaboration between the Departments of Physiology and Mechanical Engineering of the Université de Sherbrooke. The aim of the present study was thus to validate our custom-built system in newborn lambs exposed to cigarette smoke for 15 days.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals**

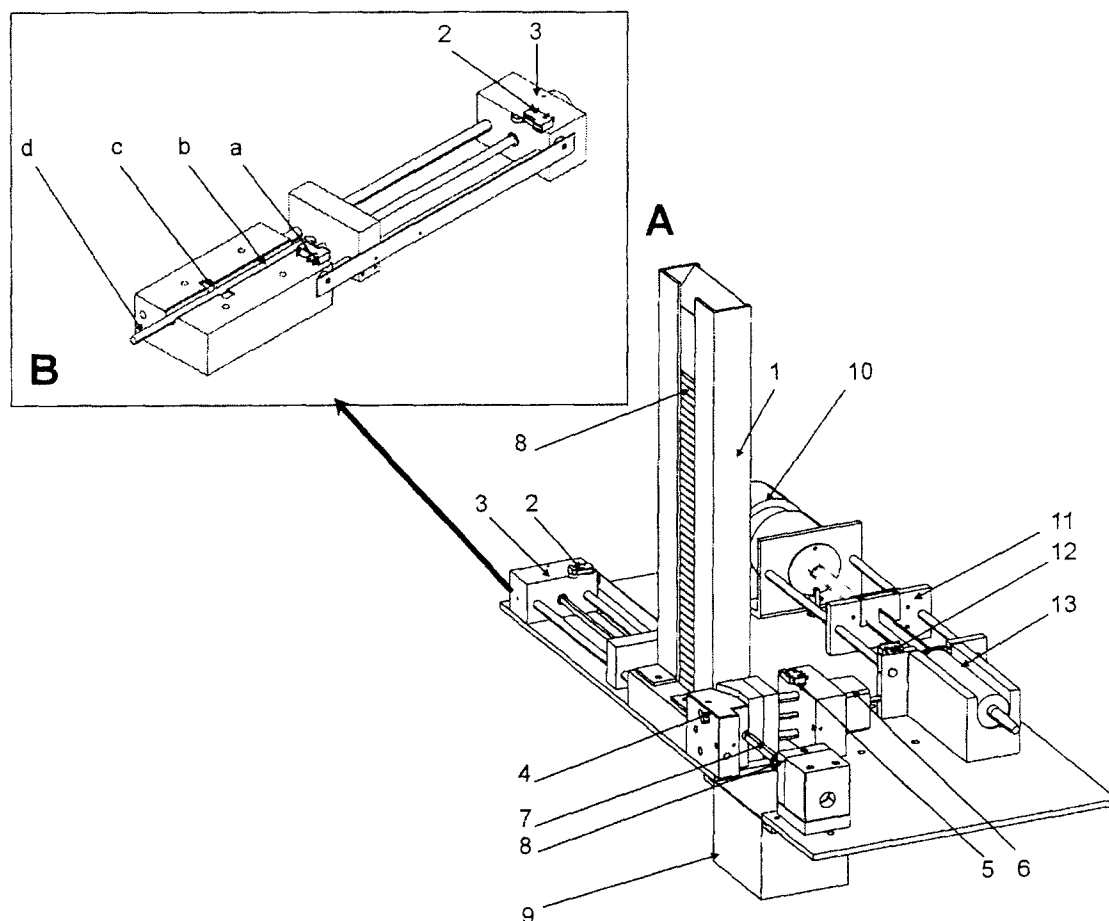
Twelve mixed bred lambs (Dorset and Romanov species) were included in the study. All lambs were born at term by spontaneous vaginal delivery in a local farm, then transferred on the same day into our animal quarters. On their arrival, they were immediately examined for clinical normality and received an IM injection of 0.75 mg selenium, 35 IU vitamin E,  $1.25 \cdot 10^5$  IU vitamin A and  $15 \cdot 10^3$  IU vitamin K. Daily cigarette smoke exposure was performed from day one to day fifteen, for a period of eight hours per day in a Plexiglas exposure chamber with a stainless steel floor covered by a soft absorbent mattress. Between exposure periods, lambs were kept in pair in an animal pen with wood bedding and hay. Daylight cycle was 6:00 – 18:00, humidity 50% and ambient temperature 24-26°C, as recommended by the Canadian Council on Animal Care. Lambs were bottle-fed with ewe milk throughout their stay in our animal quarters, but were not given colostrum. The study protocol was approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Sherbrooke.

### **Equipment**

A full system including an automatic, programmable cigarette smoking machine and a whole body exposure chamber was designed and built to expose freely moving lambs to both MS and SS. In brief, cigarette smoke is produced by an ASM set to mimic the action of a smoker. Both MS and SS smoke are circulated in a whole body exposure chamber coupled with an in-line fan, which vents the smoky air out of the chamber *via* a filtration unit and into the main air evacuation system of the room.

### The automatic cigarette smoking machine

The apparatus is comprised of several components allowing for the automatic smoking of cigarettes, according to researcher-programmable parameters, and to produce both mainstream and sidestream smoke (fig 1).



**Figure 1:** Technical schematics of the automatic smoking machine without tubing. **A** : 1. cigarette magazine; 2. limit switch sensor; 3. 24-volt motor; 4. holding unit; 5. limit switch sensor; 6. step by step motor; 7. cigarette; 8. car lighter; 9. ashtray; 10. 24-volt DC motor; 11. screw and sliding rods; 12. limit switch sensor; 13. 60 ml plastic syringe. **B** :Extracting unit: a. limit switch sensor, b. 13 mm slot, c. photomicrosensor, d. extracting rod.

**Extracting unit.** The extracting unit consists of a cigarette magazine and an extracting system. The cigarette drops down by gravity from the cigarette magazine to a 13 mm slot where a photomicrosensor (EE-SPX303, Omron Canada Inc., Toronto, ON, Canada) detects its presence. Thereafter, a 24V motor (S1054B, Colman Motor Products, Des Plaines, IL, USA) activates an extracting rod, which pushes the cigarette through the slot (from left to right, see fig 1) to the holding unit. Two limit switch sensors (5A250V, Omron Electronics, Toronto, ON, Canada) and a photomicrosensor (EE-SX872, Omron Electronics, Toronto, ON, Canada) are responsible for the precise positioning of the extracting rod.

**Holding unit and lighting unit.** When the cigarette pushed by the extracting rod reaches the lighter, a Mini-Beam sensor (SM312 FPH, Banner, Minneapolis, MN, USA) confirms the presence of the cigarette and activates the holder closure on the filter. Holder closure/opening is powered by a step by step motor (Z817G BKN-10-6, Eastern Air Devices, Dover, NH, USA). The open state is assured by a limit switch sensor (Omron Electronics, Toronto, ON, Canada), while the closed state is assured by an inductive sensor (DC 3-/4-Wire M8, Balluff Canada Inc, Mississauga, ON, Canada) and a step motor driver (2035, Applied Motion Products, Watsonville, CA, USA). As soon as the cigarette is firmly in position, a car lighter (212111, Casco Product Corporation, Bridgeport, CT, USA) is activated by a photomicrosensor for two seconds. The cigarette lighter unit is PVC isolated from the rest of the machine to prevent heat transfer and an electric transformer is connected to the lighter cable to prevent electrical transfer.

**Smoking unit.** The smoking unit includes a 60 ml plastic syringe + tubing to collect the mainstream and sidestream smoke from the burning cigarette as well as vent it out to the exposure chamber. The unit is powered by a 24V DC motor (22VM51-020-5, Honeywell POMS, Herndon, VA, USA) connected to the piston of the 60 ml syringe via a screw and sliding rods. The syringe piston is pulled to aspirate the cigarette smoke from the holder unit to the syringe through a rubber tube (Fisherbrand diameter: 3/8"; wall thickness: 1/16", Pure Natural Rubber Tubing, Fisher Scientific, Ottawa, Canada). The syringe piston is then pushed to vent the

smoke out of the syringe to the exhaust hose of the smoking machine (tumble-dryer vent hose) through a second similar rubber tube. Both tubes are connected to the syringe using a Y connector. The inflow and outflow from the syringe is assured by a pinch valve activated by a solenoid (HS2506, Kuhnke Automation Inc., Wayne, N.J., USA). When the cigarette is detected as fully smoked (7 mm before the filter) by a Mini-Beam sensor (SM312 FPH, Banner, Minneapolis, MN, USA) or when the preset time limit (five minutes) is reached, the cigarette holder opens and the extracting rod subsequently pushes the cigarette into the ashtray below half-filled with water. The smoking machine is enclosed in an airtight box made of stainless and Plexiglas. The exhaust hose is located on the superior portion of the right side of the box and is connected to the exposure chamber. An in-line fan, located on the other side of the exposure chamber, continuously vents both the mainstream and sidestream smoke from the box into the exposure chamber and then to the main air evacuation system of the room.

**Control system.** A Programmable Logic Controller (VersaMax Micro PLC, GEFanuc, Charlottesville, VA, USA) ensures the overall control of the smoking machine. The controller is connected to a graphical interface (Data panel 45, GEFanuc, Charlottesville, VA, USA), which allows for easy control of a number of parameters to reproduce various smoking habits and hence various smoke exposures. The adjustable parameters include the number of cigarettes to be smoked for a given exposure (1 to 40 cigarettes), the time interval between 2 cigarettes (1 to 60 minutes), the volume of each puff (1 to 60 ml) and the time between 2 puffs (1 to 60 seconds). Duration of puffs is set at 2 seconds. Overall, this user-friendly interface allows for a high versatility of the control system.

In our laboratory, the ASM is operated in a room fully equipped with continuous monitoring and alarm system (temperature, humidity, pressure, ventilation system, smoke detection). Hence, no monitoring and alarm system was included in the ASM itself, apart for an emergency stop button to prevent hazards during maintenance. The ASM is operated at daytime only, with at least hourly

observation by a dedicated technician trained to check for good running of the equipment.

### The exposure chamber

The whole body exposure chamber is composed of 1 cm thick-Plexiglas. Dimensions are 1.2 m (length) x 1.2 m (width) x 1 m (height) with a floor surface of 1.44 m<sup>2</sup>, in accordance with Canadian Council on Animal Care standards for housing either one pregnant ewe or two newborn lambs at the same time. The chamber is airtight, easy to clean and simple to move using wheels. Air is vented from the smoking machine into the chamber through a tumble-dryer vent hose (diameter: 10.2 cm) using an in-line fan (PF100P Marbuco, Sherbrooke, Qc, Canada). Air flows out of the chamber through an identical hose and an exhaust filtration unit attached to the room ventilation system. The exhaust filtration unit is comprised of a foam pre-filter for big particles, a charcoal filter and a HEPA filter. The in-line fan is permanently set to provide the level of ventilation required by the Canadian Council on Animal Care for one ewe or two lambs, *i.e.*, 0.6-0.7 m<sup>3</sup>/min. Calibration and setting of the fan can be modified using a Handheld Digital Airflow/temperature Meter (HHF92A, Omega Canada, Laval, QC, Canada), ultimately allowing to adapt the chamber to different animal species.

### Design of the validation study

For this study, the automatic smoking machine was preset at 2-second puff duration, 35 ml puff volume (in accordance with ISO 3308 norms) and an interval of 30 seconds between 2 puffs. Measurements of carbon monoxide levels using the Q-trak plus 8554 system (TSI Inc. Shoreview, MN, USA) and particulate matter (including particulates < 10 µm and respirable particulates < 2.5 µm) using TSI Dustrak 8520 (Ashtead Technology, Montreal, Canada) were performed in the



exposure chamber in C10 and C20 conditions during a four-hour period to assess basal characteristics of our exposure conditions in the absence of the lambs.

At their arrival in our animal quarters, all lambs underwent sterile surgery at day one of life under local anesthesia (xylocain 2%) in order to introduce an arterial catheter in the brachial artery to collect blood samples for measuring pH, arterial  $PO_2$  and  $PCO_2$ ,  $HCO_3^-$  concentration and hemoglobin oxygen saturation. The catheter was left in place for the entire duration of the study and flushed twice daily with heparin solution. Daily exposure to cigarette smoke (Peter Jackson King size, the most popular brand in Quebec at the time of the study) was performed from the first to fifteenth day of life from 8:00 to 12:00 and from 12:30 to 16:30. At 12:00, lambs were bottle-fed with ewe milk *ad libitum* and a urine sample was collected for cotinine and creatinine measurement (24-hour U-Bag for newborn, Libertyville, IL, USA). Before and after each daily exposure, lambs were also bottle-fed *ad libitum* with ewe milk. Body temperature and weight were measured daily at the beginning of the exposure and an arterial blood sample was collected at the beginning and at the end of the exposure. Three groups of randomly selected lambs were studied: four control lambs were housed in the exposure chamber throughout the 15 day-period, but exposed to air only (C0); four other lambs were exposed to ten cigarettes per day (C10); finally, four lambs were exposed to twenty cigarettes per day (C20). Lambs were systematically exposed in pair in the Plexiglas chamber, at a temperature of 24-26°C, according to guidelines from the Canadian Council on Animal Care for newborn lambs. Well-being of the lambs was ensured throughout the exposure period by hourly observation by the technician specialized in animal care and assigned to good running checking of the ASM. No recording was performed during exposure. Usual endpoints for lambs were included in the protocol accepted by our Institutional Animal Care and Use Committee.

At day twelve of life, aseptic surgery was performed under general anesthesia (1–2% isoflurane; 30%  $NO_2$ ; 68%  $O_2$ ). Atropine sulphate (150  $\mu$ g/kg IM) was given preoperatively with ketamine (10 mg/kg). Antibiotics (5 mg/kg gentamicin and

7,500 IU/kg Duplocillin) were administered intramuscularly before surgery and daily thereafter until the end of the experiment. One dose of ketoprofen (3 mg/kg IM) was systematically given immediately after induction of anesthesia for analgesia; an identical dose of ketoprofen was repeated after surgery if needed. Two E2-12 platinum needle-electrodes (E2-12, Grass Instruments Company, Quincy, MA, USA) were glued on ribs at the level of the proximal forelegs for recording electrocardiogram (ECG). One E2-12 platinum needle-electrode was also inserted under the scalp as a ground. Leads from these electrodes were subcutaneously tunneled to exit on the back of the lamb. In addition, custom-made electrodes were inserted into a glottal adductor for recording electromyographic activity and two platinum needle-electrodes were inserted into the parietal cortex directly through the skull for electrocorticogram (ECoG) recording, as part of another protocol aimed at studying the effect of ETS on swallowing-breathing coordination. At the end of the 15 day-exposure period, *i.e.*, 3 days after surgery, a polysomnographic recording was performed during 4 hours in freely-moving lambs while in the Plexiglas chamber, but after completion of smoke exposure. Just before the recording, two respiratory inductance plethysmography bands were placed on the thorax and the abdomen and a nasal thermocouple glued on the lateral aspect of the nostril for monitoring respiration. Heart and respiratory rates calculated from those recordings (Acknowledge 3.7.3 software, Biopac, Santa Barbara, CA, USA) were used in the present validation study. Following completion of the polysomnographic recordings, lambs were euthanized with an intravenous overdose of pentobarbital (90 mg/kg). The larynx and first 2 cm of the trachea were collected and fixed in 10% formaldehyde for histological assessment of local inflammation.

### **Data analysis**

Weight and arterial blood gases were averaged daily for each group of lambs. Arterial blood gases were corrected for lamb temperature (15). At day fifteen, heart rate (HR) and respiratory rate (RR) were calculated for each stable 60-second

epoch and averaged in each lamb over the entire recording. Urinary cotinine was measured using an Elisa immunoassay kit (Bio-Quant COTININE Direct Elisa, San Diego, CA, USA). Collected urine samples (3 ml) were stored at - 20 °C until measurement. Cotinine dosage was preferred to nicotine because of its longer half-life (15-20 h vs. 30 min-2 h respectively), its slow renal elimination and high urinary concentration (6- to 25-fold nicotine concentration). Creatinine was measured in the Department of Clinical Biochemistry at the Sherbrooke University Hospital using a Vitros 950 chemistry system (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA). Cotinine/creatinine ratio was calculated at day fourteen and fifteen and first averaged for each lamb and thereafter for each group. Collected laryngeal tissues were grossly sectioned and placed in a cassette for dehydration and fixation in paraffin. Paraffin blocs were cut in 3µm slices using a microtome and stained with eosin-hematoxylin. Inflammation was then graded for epithelial and subepithelial changes at the level of the larynx and epiglottis (16).

## **RESULTS**

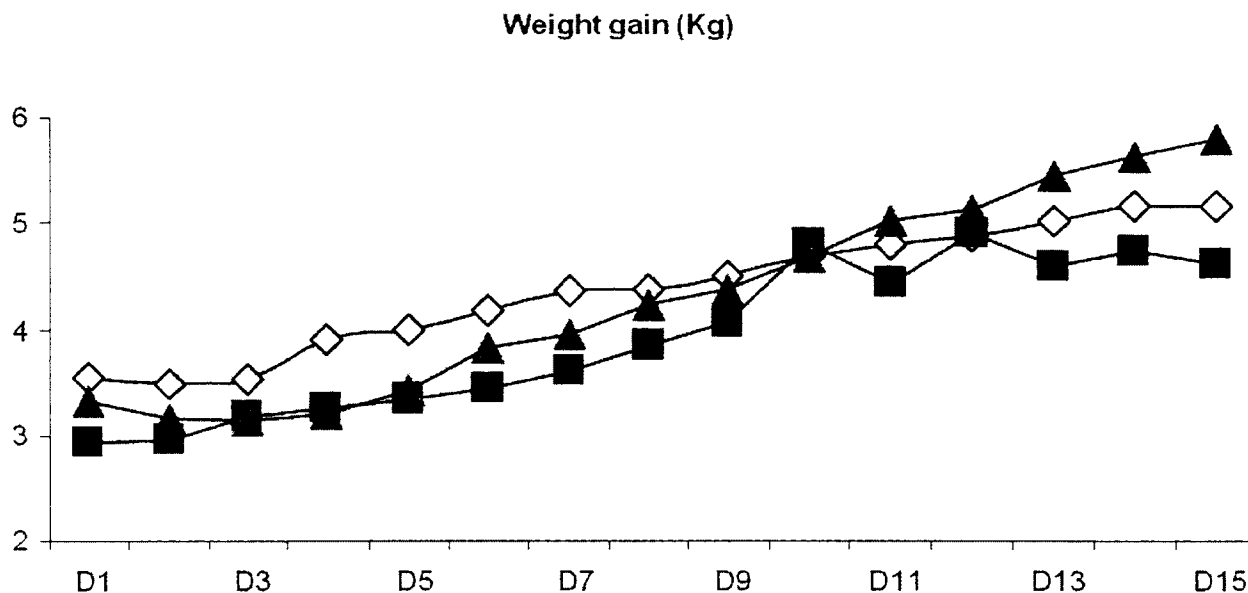
### **Functioning of the automatic smoking machine**

The automatic smoking machine met all our requirements for studying ETS exposure (both sidestream and mainstream smoke) in freely-moving lambs for 15 days, while providing a versatile, user-friendly interface. Two resolvable problems were encountered during the validation period. The first was related to sleep disruption of the lambs by the too noisy ASM, which was solved by enclosing the ASM in a stainless and Plexiglas box. The second problem was related to the cigarette magazine; gravity was not always sufficient for the cigarette to drop down. This was also rapidly solved by adding a small weight (copper "cigarette") on top of the cigarette stack.

### **Behavior, weight gain and cardiorespiratory function**

All lambs except one (diarrhea for 8 days) tolerated the 15 day-exposure to cigarette smoke without any apparent problems. Indeed, no differences in sleep, respiration and feeding were clinically apparent between controls and exposed lambs. Figure 2 illustrates that mean weight at the onset of exposure and weight gain (C0:  $126 \pm 23 \text{ g.day}^{-1}$ ; C10:  $157 \pm 49 \text{ g.day}^{-1}$ ; C20:  $141 \pm 65 \text{ g.day}^{-1}$ ) were identical in the three groups. However, although not quantified, an increase in spontaneous activity during wakefulness was noted in C10 and especially C20 lambs. Of note, lambs did not show any sign of distress while in the exposure chamber.

Results on resting respiratory rate, calculated from polysomnographic recordings performed at postnatal day 15, showed no differences between groups (C0:  $41 \pm 10 \text{ min}^{-1}$ ; C10:  $38 \pm 9 \text{ min}^{-1}$ ; C20:  $37 \pm 8 \text{ min}^{-1}$ ), while C20 exposure seemed to increase heart rate (C0:  $178 \pm 26 \text{ min}^{-1}$ ; C10:  $176 \pm 14 \text{ min}^{-1}$ ; C20:  $191 \pm 15 \text{ min}^{-1}$ ). Arterial blood gas values, obtained for control, C10 and C20 lambs, were respectively  $\text{PaO}_2 = 85 \pm 5 \text{ mmHg}$ ,  $88 \pm 6 \text{ mmHg}$ ,  $92 \pm 11 \text{ mmHg}$ ;  $\text{PaCO}_2 = 44 \pm 8 \text{ mmHg}$ ,  $46 \pm 4 \text{ mmHg}$ ,  $42 \pm 2 \text{ mmHg}$ ;  $\text{pH} = 7.36 \pm 0.05$ ,  $7.40 \pm 0.04$ ,  $7.41 \pm 0.06$  and  $[\text{HCO}_3^-] = 23 \pm 2 \text{ mmol/L}$ ,  $27 \pm 4 \text{ mmol/L}$ ,  $25 \pm 2 \text{ mmol/L}$ ; hemoglobin saturation in  $\text{O}_2 = 95 \pm 4\%$ ,  $97 \pm 1\%$ ,  $97 \pm 1\%$ .



**Figure 2:** Mean weight throughout the fifteen days of exposure. White diamonds are for control lambs (C0), black squares for daily exposure to ten cigarettes (C10), gray triangles for daily exposure to twenty cigarettes (C20).

### Urine cotinine measurement

Mean values of urinary cotinine / creatinine ratio at day fourteen and fifteen were  $11 \pm 7 \text{ ng.mg}^{-1}$  for C0 lambs, as compared to much higher values obtained in both the C10 group ( $961 \pm 539 \text{ ng.mg}^{-1}$ ) and C20 group ( $1821 \pm 312 \text{ ng.mg}^{-1}$ ).

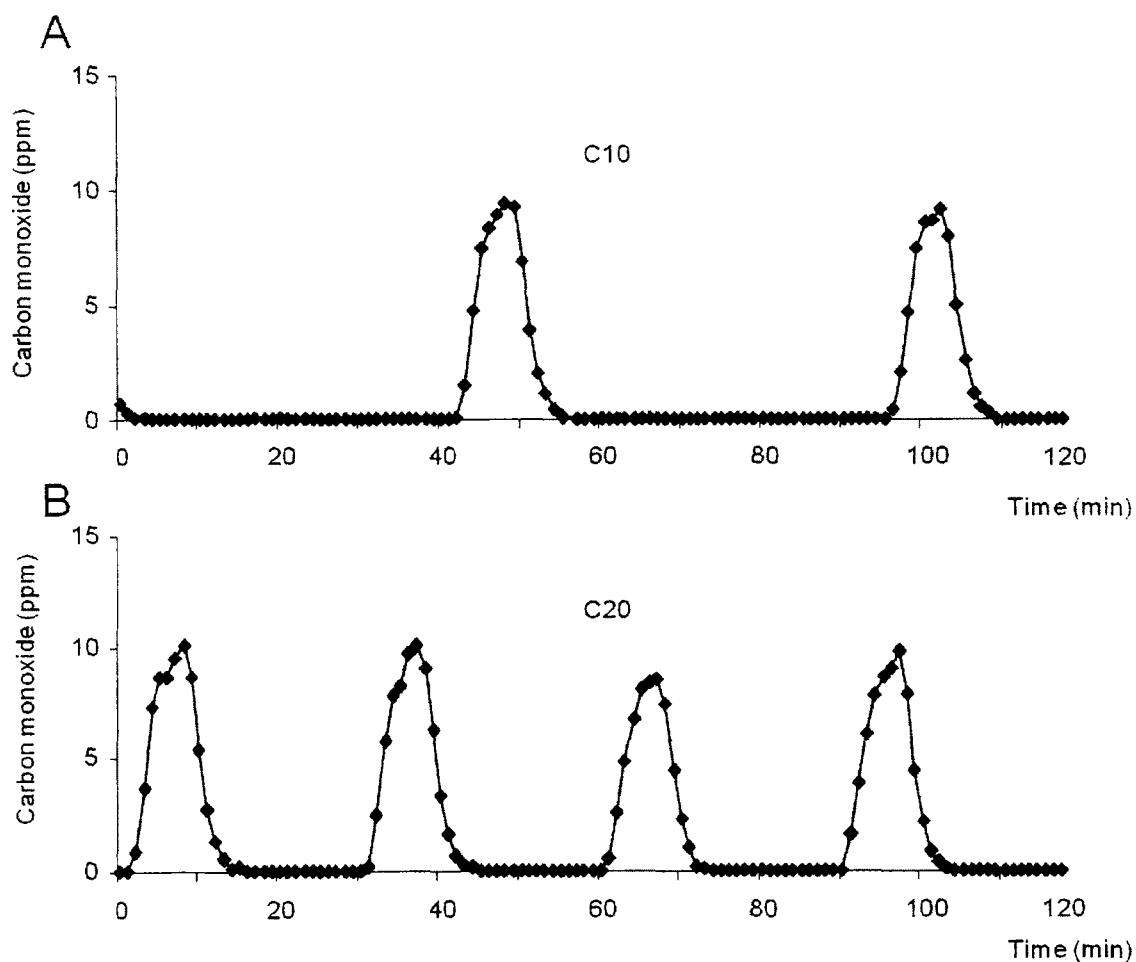
### Carbon monoxide and particulate matter measurement

Carbon monoxide was measured in the Plexiglas chamber in the absence of lambs, while temperature was  $20.9 \pm 0.1^\circ\text{C}$  and relative humidity  $43.2 \pm 1.1\%$ . Cigarette burning was consistently responsible for a peak in CO (from 9 to 10 ppm) during 10-15 minutes, and CO value was zero between peaks. CO peaks were twice as frequent in C20 lambs comparatively to C10 lambs, as shown in figure 3.

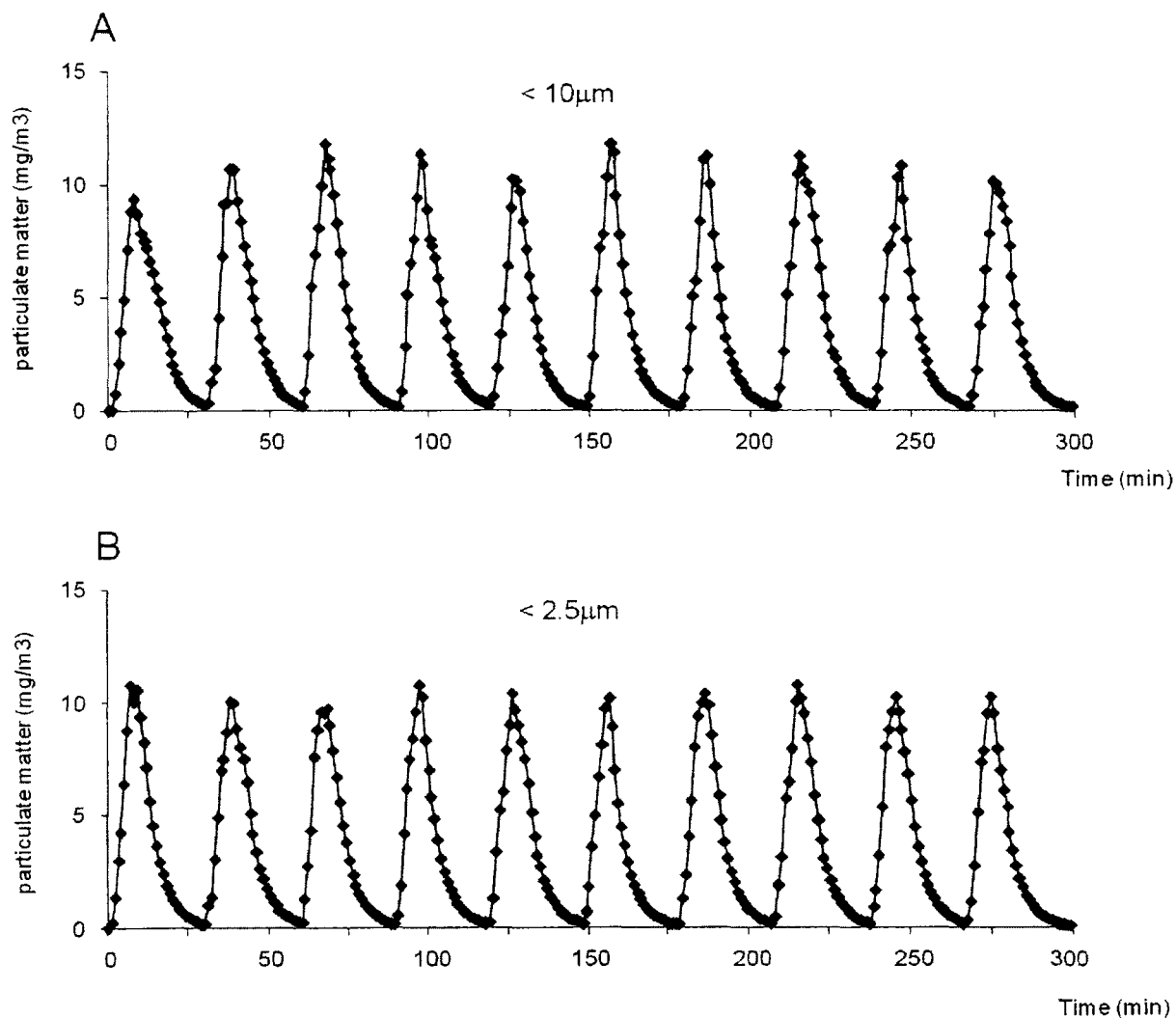
Similar variations of particulate matter concentration were measured, with peaks reaching 10-11 mg/m<sup>3</sup>. As expected, nearly all particulates had a mass median aerodynamic diameter inferior to 2.5 µm (figure 4).

### Histological examination of larynx and epiglottis

No significant epithelial or subepithelial inflammation was observed in the larynx of either C10 (mean score 1.8/15) or C20 (mean score 0.5/15) lambs using the inflammation scoring system of Koufman et al. 1991, when compared to controls lambs (mean score 0/15).



**Figure 3:** Carbon monoxide concentration in the ambient air during exposure to ten cigarettes (C10) or twenty (C20) cigarettes daily.



**Figure 4:** Time variation of particulate matter concentration in the Plexiglas chamber during exposure to twenty cigarettes (C20) daily. A : particulates < 10  $\mu\text{m}$  ; B : particulates < 2.5  $\mu\text{m}$ . Results show intermittent exposure with particulate concentration increasing transiently with each smoked cigarette. As expected, median aerodynamic diameter is almost entirely in the “respirable” (< 2.5  $\mu\text{m}$ ) particulate range.

## DISCUSSION

In the present study, we were able to validate a new custom-built automatic smoking machine primarily designed to be versatile, user friendly, and which can be used and set to different conditions by non-specialized personnel to study the effects of ETS surrogate in non-restrained, developing lambs. Whilst our preliminary experience with the use of the machine allowed us to readily correct the very few initial problems that arose, such as the noise associated with the running of the machine and the malfunctioning of the cigarette magazine, overall, our ASM has proven to be ideally suited to our needs.

Various smoking machines have been built for the tobacco industry throughout the years, with the primary aim of assessing and modulating the levels of various constituents in cigarette smoke. The first smoking machines were manually-operated and able to burn only one cigarette at a time; in addition, only mainstream smoke could be studied. Subsequent smoking machines (*e.g.*, Filtrona ASM) were automatic, able to burn several cigarettes and a number of parameters could be set. Currently available ASM for the tobacco industry, such as the Borgwaldt or Cerulean ASM, can burn up to 20 cigarettes with 4 different smoking regimes (puff duration and volume, time interval between 2 cigarettes) at the same time. The exact concentration of several smoke constituents, including nicotine, carbon monoxide and total/respirable suspended particulate matter can be automatically analyzed in SS and/or MS. While some of those ASM have been used in animal inhalation studies, they are primarily made for the tobacco industry, to provide precise chemical analysis of MS and/or SS under standardized regimens (FTC/ISO standards), which is mandatory in many countries (12).

Various systems have been used since the 1950s in numerous animal inhalation studies to assess the effect of MS or ETS (see Coggins 2007 for review). Most often, ETS surrogates used in previous studies were diluted and aged SS (17-19)



or room-aged (20, 21) SS, with no exhaled MS, due to the technical difficulty to produce the latter. However, chemical composition of MS and SS is known to be different, especially due to the lower temperatures, which generate SS, as compared to MS (11). We have taken a somewhat different approach. In our system, the ETS surrogate, to which each lamb is exposed, is not simply the smoke generated by the ASM (fresh SS and MS). It is rather a mixture of SS, MS and exhaled MS (from the other lamb), which is diluted by the system ventilation and somewhat aged in the exposure chamber. Also, continuous measurement of CO (figure 3) and particulate matter concentration (figure 4) shows that exposure level follows important variations with time. We believe that such an ETS surrogate exposure is at least as relevant as continuous exposure to aged and diluted SS alone with a fixed composition for our studies attempting to infer the effects of ETS on infants. Indeed, infants are often nursed in the immediate vicinity of the smoker (in their arms), hence the levels of SS and exhaled MS, to which they are exposed, inevitably vary with time. Finally, it must be recognized that, while no ETS surrogate perfectly reproduces real life ETS, composition of the latter is highly variable with the cigarette brand, the smoker and from one moment to another (12).

The user-friendly interface, which enables to change the programming of the various parameters independently from one another, is a unique characteristic of our ASM. In the present validation study, the ASM parameters (time interval between 2 cigarettes, volume of each puff) were set in accordance with the ISO 3308 norms established in 1977, except for the time between two puffs, which has since been shown to be, on average, 30 seconds instead of 60 seconds (22). While our ASM is not currently designed to deliver exact levels of smoke constituents, the latter can be easily modulated by varying the number or pattern cigarettes are burnt, *e.g.*, frequency, duration and/or volume of the puffs (see ISO 3308), and/or by modifying exposure chamber venting. In addition, rather than burning several cigarettes at the same time, the exposure level can be increased by decreasing the time duration between two cigarettes from one hour to one minute. The level of exposure can then be readily assessed by measuring urinary

cotinine, whose knowledge again may be more relevant to animal exposure studies than that of constituent levels in smoke. Indeed, intermittent repeated exposure to cigarette smoke constituents, such as gases or suspended particulates, may bear different physiological effects than constant exposure to the same chemicals. An important result in our validation study concerns urinary cotinine/creatinine measurements in C10 and C20 lambs, which are in keeping with findings in infants exposed to ETS (23-26).

Most studies on the effects of cigarette smoke in adult animals have been performed in rodents (19). The few studies on the effects of cigarette smoke in adult, non-rodent species were performed either acutely in anesthetized ewes through a tracheal tube (27), or chronically in tracheotomized sheep (28, 29) and dogs (19, 30), in intact dogs using a mask (31, 32) or in baboons taught to inhale through the mouth (33). Studies in large newborn mammals were also initially performed in lambs as a model of bronchitis, using a tracheostomy tube (29) or an ASM custom-made from a Bird ventilator (29, 34). More recently, studies on the cerebral effects of chronic cigarette smoke exposure (up to 13 months) were performed in non-sedated newborn rhesus monkeys (14, 35). In these latter studies, the Teague ASM originally built for rodent or cell exposure (17) was used in association with a 3.5 m<sup>3</sup> exposure chamber similar to the Plexiglas chamber used in the present study. Whole body exposure was preferred in the present study, both for ethical considerations (no contention) and to better mimic real life exposure in infants.

To the best of our knowledge, our ASM is the first specifically designed and validated device for large newborn mammals. An advantage of our equipment, both from a physiological and ethical standpoint, is the possibility to house two newborn lambs at the same time in the exposure chamber. Moreover, dimensions of our exposure chamber allow to house one ewe during gestation. Furthermore, our chamber could readily accommodate various animal species such as piglets, dogs, cats, monkeys or encaged rodents. Versatile programming of the various

parameters of our ASM *via* the user-friendly interface allows for easy adaptation of ETS surrogate to every experimental condition and animal, up to the size of an adult sheep.

Although results from previous studies suggest that some brain effects can be directly ascribed to nicotine exposure alone in the perinatal period (36), ETS studies clearly remain important. Indeed, while we did not observe upper airway inflammation, which may be a significant risk factor for SIDS or apparent life-threatening events in infants *via* alteration of upper airway sensitivity (37), comparing the effects of nicotine alone to the effects of ETS surrogate using our ASM in the same study would allow recognizing the direct effect of nicotine more readily. Of note, the increased activity observed in some lambs during ETS surrogate exposure in the present study is remindful of the behavioural problems reported in children following ETS exposure (38), such as attention-deficit hyperactivity disorder (39).

The choice to perform our validation exposure using postnatal instead of prenatal (or prenatal added to postnatal) exposure was not solely based on the cost or easiness of caring for lambs, comparatively to a ewe. Previous studies on the effects of cigarette smoke exposure on brain cell damage in monkeys suggest that postnatal exposure has the same consequences as prenatal and prenatal added to postnatal exposure, probably due to adaptive changes in defense mechanisms (14). Accordingly, part of our forthcoming research program will focus on postnatal exposure to cigarette smoke.

In conclusion, the automatic smoking machine designed herein is able to mimic mainstream and side-stream cigarette smoke exposure of variable intensity. Validation of the machine has shown that our initial aim to build a versatile, user-friendly device for use in newborn lambs has been reached. Our newborn ovine models will be used to better ascertain the effect of cigarette smoke exposure on

laryngeal chemoreflexes, swallowing-breathing coordination, control of heart rhythm variability, all of which are involved in apparent life-threatening events of infancy and sudden infant death syndrome. In addition, our versatile equipment, which can easily be built by other research teams using the information provided herein, can be readily used in large as well as small animal species to assess the biological effects of cigarette smoke exposure, especially in the perinatal period.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Jean-Philippe Gagné and Nathalie Samson and Dr. Alexandre Doueik for histological analyses. The study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (Grant MOP 15558) and the Foundation of Stars. J-P Praud is the holder of the Canada Research Chair in Neonatal Respiratory Physiology and a member of the *FRSQ-funded Centre de recherche clinique Etienne-Le Bel du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke*.

## REFERENCES

- (1) Adgent MA. Environmental tobacco smoke and sudden infant death syndrome: a review. *Birth Defects Res.B.Dev.Reprod.Toxicol.* 2006 Feb;77(1):69-85.
- (2) Alm B, Milerad J, Wennergren G, Skjaerven R, Oyen N, Norvenius G, et al. A case-control study of smoking and sudden infant death syndrome in the Scandinavian countries, 1992 to 1995. The Nordic Epidemiological SIDS Study. *Arch.Dis.Child.* 1998 Apr;78(4):329-334.
- (3) DiFranza JR, Aligne CA, Weitzman M. Prenatal and postnatal environmental tobacco smoke exposure and children's health. *Pediatrics* 2004 Apr;113(4 Suppl):1007-1015.
- (4) Horne RS, Franco P, Adamson TM, Groswasser J, Kahn A. Influences of maternal cigarette smoking on infant arousability. *Early Hum.Dev.* 2004 Aug;79(1):49-58.
- (5) Hunt CE, Hauck FR. Sudden infant death syndrome. *CMAJ* 2006 Jun 20;174(13):1861-1869.
- (6) McDonnell M, Mehanni M, McGarvey C, Oregan M, Matthews TG. Smoking: the major risk factor for SIDS in Irish infants. *Ir.Med.J.* 2002 Apr;95(4):111-113.
- (7) Slotkin TA. If nicotine is a developmental neurotoxicant in animal studies, dare we recommend nicotine replacement therapy in pregnant women and adolescents? *Neurotoxicol.Teratol.* 2008 Jan-Feb;30(1):1-19.
- (8) Mitchell EA, Milerad J. Smoking and the sudden infant death syndrome. *Rev.Environ.Health* 2006 Apr-Jun;21(2):81-103.
- (9) Anderson HR, Cook DG. Passive smoking and sudden infant death syndrome: review of the epidemiological evidence. *Thorax* 1997 Nov;52(11):1003-1009.
- (10) McMartin KI, Platt MS, Hackman R, Klein J, Smialek JE, Vigorito R, et al. Lung tissue concentrations of nicotine in sudden infant death syndrome (SIDS). *J.Pediatr.* 2002 Feb;140(2):205-209.
- (11) Moir D, Rickert WS, Levasseur G, Larose Y, Maertens R, White P, et al. A comparison of mainstream and sidestream marijuana and tobacco cigarette smoke produced under two machine smoking conditions. *Chem.Res.Toxicol.* 2008 Feb;21(2):494-502.
- (12) Thielen A, Klus H, Muller L. Tobacco smoke: unraveling a controversial subject. *Exp.Toxicol.Pathol.* 2008 Jun;60(2-3):141-156.

- (13) Slotkin TA, Pinkerton KE, Tate CA, Seidler FJ. Alterations of serotonin synaptic proteins in brain regions of neonatal Rhesus monkeys exposed to perinatal environmental tobacco smoke. *Brain Res.* 2006 Sep 21;1111(1):30-35.
- (14) Slotkin TA, Pinkerton KE, Seidler FJ. Perinatal environmental tobacco smoke exposure in rhesus monkeys: critical periods and regional selectivity for effects on brain cell development and lipid peroxidation. *Environ.Health Perspect.* 2006 Jan;114(1):34-39.
- (15) Andritsch RF, Muravchick S, Gold MI. Temperature correction of arterial blood-gas parameters: A comparative review of methodology. *Anesthesiology* 1981 Sep;55(3):311-316.
- (16) Koufman JA. The otolaryngologic manifestations of gastroesophageal reflux disease (GERD): a clinical investigation of 225 patients using ambulatory 24-hour pH monitoring and an experimental investigation of the role of acid and pepsin in the development of laryngeal injury. *Laryngoscope* 1991 Apr;101(4 Pt 2 Suppl 53):1-78.
- (17) Teague SV PK. sidestream cigarette smoke generation and exposure system for environmental tobacco smoke study. *inhal toxicol* 1994;6:104-112.
- (18) Ayres PH, Mosberg AT, Coggins CR. Design, construction, and evaluation of an inhalation system for exposing experimental animals to environmental tobacco smoke. *Am.Ind.Hyg.Assoc.J.* 1994 Sep;55(9):806-810.
- (19) Coggins CR. An updated review of inhalation studies with cigarette smoke in laboratory animals. *Int.J.Toxicol.* 2007 Jul-Aug;26(4):331-338.
- (20) Haussmann HJ, Anskeit E, Becker D, Kuhl P, Stinn W, Teredesai A, et al. Comparison of fresh and room-aged cigarette sidestream smoke in a subchronic inhalation study on rats. *Toxicol.Sci.* 1998 Jan;41(1):100-116.
- (21) Stinn W, Teredesai A, Anskeit E, Rustemeier K, Schepers G, Schnell P, et al. Chronic nose-only inhalation study in rats, comparing room-aged sidestream cigarette smoke and diesel engine exhaust. *Inhal.Toxicol.* 2005 Oct;17(11):549-576.
- (22) Bridges RB, Combs JG, Humble JW, Turbek JA, Rehm SR, Haley NJ. Puffing topography as a determinant of smoke exposure. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 1990 Sep;37(1):29-39.
- (23) Blackburn CM, Bonas S, Spencer NJ, Coe CJ, Dolan A, Moy R. Parental smoking and passive smoking in infants: fathers matter too. *Health Educ.Res.* 2005 Apr;20(2):185-194.

- (24) Joseph DV, Jackson JA, Westaway J, Taub NA, Petersen SA, Wailoo MP. Effect of parental smoking on cotinine levels in newborns. *Arch.Dis.Child.Fetal Neonatal Ed.* 2007 Nov;92(6):F484-8.
- (25) Anuntaseree W, Mo-Suwan L, Ovatlarnporn C, Tantana C, Ma-a-Lee A. Exposure to environmental tobacco smoke among infants in southern Thailand: a study of urinary cotinine. *Bull.Environ.Contam.Toxicol.* 2008 Jan;80(1):34-37.
- (26) Kott KS, Salt BH, McDonald RJ, Jhawar S, Bric JM, Joad JP. Effect of secondhand cigarette smoke, RSV bronchiolitis and parental asthma on urinary cysteinyl LTE4. *Pediatr.Pulmonol.* 2008 Aug;43(8):760-766.
- (27) McTiernan MJ, Burchfield DJ, Abrams RM, Cassin S. Carboxy- and oxyhemoglobin in pregnant ewe and fetus after inhalation of marijuana, marijuana placebo and tobacco cigarette smoke. *Life Sci.* 1988;43(24):2043-2047.
- (28) Kirschbaum TH, Dilts PV, Jr, Brinkman CR, 3rd. Some acute effects of smoking in sheep and their fetuses. *Obstet.Gynecol.* 1970 Apr;35(4):527-536.
- (29) Mawdesley-Thomas LE, Healey P. Experimental bronchitis in lambs exposed to cigarette smoke. *Arch.Environ.Health* 1973 Oct;27(4):248-250.
- (30) Hammond EC, Auerbach O, Kirman D, Garfinkel L. Effects of cigarette smoking on dogs. *Arch.Environ.Health* 1970 Dec;21(6):740-753.
- (31) Cross FT, Palmer RF, Filipy RE, Dagle GE, Stuart BO. Carcinogenic effects of radon daughters, uranium ore dust and cigarette smoke in beagle dogs. *Health Phys.* 1982 Jan;42(1):33-52.
- (32) Nikula KJ, Green FH. Animal models of chronic bronchitis and their relevance to studies of particle-induced disease. *Inhal.Toxicol.* 2000;12 Suppl 4:123-153.
- (33) Rogers WR, Carey KD, McMahan CA, Montiel MM, Mott GE, Wigodsky HS, et al. Cigarette smoking, dietary hyperlipidemia, and experimental atherosclerosis in the baboon. *Exp.Mol.Pathol.* 1988 Feb;48(1):135-151.
- (34) Stecenko A, McNicol K, Sauder R. Effect of passive smoking on the lung of young lambs. *Pediatr.Res.* 1986 Sep;20(9):853-858.
- (35) Slotkin TA, Pinkerton KE, Seidler FJ. Perinatal exposure to environmental tobacco smoke alters cell signaling in a primate model: autonomic receptors and the control of adenylyl cyclase activity in heart and lung. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 2000 Nov 30;124(1-2):53-58.
- (36) Slotkin TA, Seidler FJ, Qiao D, Aldridge JE, Tate CA, Cousins MM, et al. Effects of prenatal nicotine exposure on primate brain development and attempted

amelioration with supplemental choline or vitamin C: neurotransmitter receptors, cell signaling and cell development biomarkers in fetal brain regions of rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology* 2005 Jan;30(1):129-144.

(37) Dua K, Bardan E, Ren J, Sui Z, Shaker R. Effect of chronic and acute cigarette smoking on the pharyngo-upper oesophageal sphincter contractile reflex and reflexive pharyngeal swallow. *Gut* 1998 Oct;43(4):537-541.

(38) Yolton K, Khoury J, Hornung R, Dietrich K, Succop P, Lanphear B. Environmental tobacco smoke exposure and child behaviors. *J.Dev.Behav.Pediatr.* 2008 Dec;29(6):450-457.

(39) Heffner JL, Johnson CS, Blom TJ, Anthenelli RM. Relationship between cigarette smoking and childhood symptoms of inattention and hyperactivity/impulsivity in alcohol-dependent adults without attention-deficit hyperactivity disorder. *Nicotine Tob.Res.* 2010 Jan 18.



Article 3:

### **EFFECTS OF ENVIRONMENTAL TOBACCO SMOKE ON NON-NUTRITIVE SWALLOWING-RESPIRATION COORDINATION IN NEWBORN LAMBS**

Duvareille C, St-Hilaire M, Samson N, Bakirtzian P, Brisebois S, Boheimier M, Djeddi D, Doueik A, Praud J-P

Soumis dans *Respiratory Physiology and Neurobiology*

Résumé : En période néonatale, les problèmes d'immaturation respiratoire et de déglutition sont responsables de nombreuses hospitalisations et sont impliqués dans des pathologies comme les malaises graves du nourrisson ou le syndrome de mort subite du nourrisson (SMSN). Plus précisément, la coordination déglutition non nutritive DNN-respiration est une fonction physiologique clef dans la prévention des apnées et des aspirations (Nishino et al. 1985). Cependant, les études sur la coordination DNN-respiration restent rares. Depuis la campagne qui vise à promouvoir le coucher en décubitus dorsal des bébés, la fumée environnementale de cigarette est devenue le premier facteur de risque du SMSN qui peut être prévenu. L'objectif de cette étude est d'évaluer les effets de la fumée environnementale de cigarette sur la coordination DNN-respiration.

Matériel et Méthodes : 18 agneaux nouveau-nés ont été exposés à la fumée de dix (6 agneaux, groupe C10) ou 20 cigarettes (6 agneaux, groupe C20) 8 heures par jour durant 15 jours en utilisant la machine à fumer développée dans notre laboratoire. Six agneaux contrôles supplémentaires ont été exposés à l'air (groupe C0). Au douzième jour, chaque agneau a été instrumenté de façon chronique sous anesthésie générale pour l'enregistrement par télémétrie d'un électrocardiogramme, des mouvements oculaires, d'un électrocorticogramme, du flux nasal, de l'activité des muscles thyroaryténoïdiens (constricteurs de la glotte), des mouvements respiratoires thoraco-abdominaux (pléthysmographie respiratoire d'inductance) et de la saturation transcutanée en O<sub>2</sub>. Des enregistrements polysomnographiques ont été effectués chez les agneaux nouveau-nés sans sédation ni contention ayant été exposés ou non à la fumée secondaire de cigarette.

Résultats : l'exposition à la fumée secondaire ne modifie pas la fréquence des DNN ( $p=0.9$ ) mais semble légèrement modifier la coordination DNN-respiration en sommeil calme. Ainsi, en sommeil calme les DNN de type ii ont tendance à diminuer en faveur des DNN de type ee. De plus, les DNN de type ii et ie prédominent alors que très peu de DNN ei et ee sont observées, quelle que soit l'intensité d'exposition des agneaux nouveau-nés à la fumée secondaire.

Conclusion: L'exposition à la fumée secondaire ne semble pas avoir d'effet sur la fréquence des DNN mais aurait tendance à perturber la coordination DNN-respiration chez l'agneau nouveau-né en sommeil calme.

Contributions :

Pour cet article, j'ai réalisé toutes les étapes menant à sa rédaction allant de la mise au point du plan expérimental à la rédaction de cet article, en passant par les expérimentations et l'analyse des résultats, le tout supervisé par mon directeur de recherche Dr Praud.

Comme pour les articles précédents, la contribution des étudiants du laboratoire a été indispensable pour l'instrumentation et l'enregistrement des agneaux (St-Hilaire M, Samson N, Bakirtzian P, Brisebois S, Boheimier M, Djeddi D). Quant à Alexandre Doueik, en temps que pathologiste, il nous a grandement aidé pour l'analyse histologique et cytologique des échantillons de larynx et d'épiglotte.

**EFFECTS OF POSTNATAL ENVIRONMENTAL TOBACCO SMOKE ON NON-NUTRITIVE SWALLOWING-BREATHING COORDINATION IN NEWBORN LAMBS**

**Charles Duvareille<sup>1</sup>, Marie St-Hilaire<sup>1</sup>, Nathalie Samson<sup>1</sup>, Parseh Bakirtzian<sup>1</sup>,  
Simon Brisebois<sup>1</sup>, Mathieu Boheimier<sup>1</sup>, Djamal-Dine Djeddi<sup>1</sup>, Alexandre A.  
Doueik<sup>2</sup>, Jean-Paul Praud<sup>1</sup>**

Neonatal Respiratory Research Unit; Department of Pediatrics and Physiology<sup>1</sup>  
and pathology<sup>2</sup>, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC - Canada

Running title: Cigarette smoke and swallowing in the newborn

Address for correspondence

Jean-Paul Praud MD PhD  
Departments of Pediatrics and Physiology  
Université de Sherbrooke  
J1H 5N4 - QC – Canada  
Email : [Jean-Paul.Praud@USherbrooke.ca](mailto:Jean-Paul.Praud@USherbrooke.ca)  
Fax: 1 (819) 564-5215  
Phone: 1 (819) 346-1110, ext 14851

## ABSTRACT

While prenatal environmental tobacco smoke (ETS) exposure is a well-known risk factor for sudden infant death syndrome, the effect of postnatal ETS exposure is less clear. The objective of our study was to investigate the effect of postnatal ETS exposure on non-nutritive swallowing (NNS) and NNS-breathing coordination. Twelve newborn lambs were exposed to either ten or twenty cigarettes per day for 15 days. Six controls were exposed to air. Lambs were instrumented for recording states of alertness, swallowing, electrocardiogram and breathing; recordings were performed in non-sedated lambs at the end of ETS exposure. Urinary cotinine/creatinine ratio confirmed the real-life relevant exposure. Postnatal ETS exposure had no effect on NNS frequency but tended to decrease inspiratory NNS ( $p = 0.07$ ) during quiet sleep. No effect on respiratory or heart rate ( $p > 0.6$ ), apnea index ( $p = 0.2$ ) or sleep states ( $p = 0.3$ ) was observed. In conclusion, postnatal ETS exposure in lambs had only mild effects on NNS.

**Keywords:** cigarette smoke, polysomnography, apnea, sudden infant death syndrome

## 1. INTRODUCTION

The early postnatal period is crucial for the newborn, due to the immaturity of a number of vital functions such as breathing and swallowing. Non-nutritive swallowing (NNS) is essential for clearing upper airway secretions and laryngopharyngeal refluxes, which are a frequent occurrence in newborns. In addition, a perfect NNS-breathing coordination is crucial to prevent cardiorespiratory events, due to laryngeal penetration and/or tracheal aspiration of saliva or gastric refluxate (Thach and Menon, 1985). Alterations of the perinatal maturation of NNS and NNS-breathing coordination may thus be involved in potentially dramatic pathologies, such as apneas of prematurity, apparent life-threatening events and sudden infant death syndrome (SIDS). However, studies on NNS and NNS-breathing coordination in the neonatal period are relatively rare (Kelly et al., 2006, 2008; Nixon et al., 2008; Wilson et al., 1981).

Following the worldwide campaign to promote supine sleep in infants, perinatal environmental tobacco smoke (ETS) appears as the main preventable risk factor for sudden infant death syndrome (SIDS) (Adgent, 2006; Liebrechts-Akkerman et al., 2011). Prenatal and postnatal ETS exposure would increase SIDS by 2 to 5 times (Anderson and Cook, 1997; Liebrechts-Akkerman et al., 2011), and one third of SIDS victims could be prevented by avoidance of prenatal ETS (Mitchell and Milerad, 2006). In addition, the observation that 75% of the 40% of women who stop smoking before or during pregnancy relapse postpartum (Bottorff et al., 2000) suggests it is important to investigate postnatal ETS exposure alone. The few studies on the effects of tobacco smoke exposure on swallowing function have been virtually restricted to chronic, adult smokers. Alterations of both swallowing and major protective mechanisms against aspiration (the pharyngo-glottal closure and upper esophageal sphincter closure reflexes) were observed in chronic smokers (Dua et al., 1998, 2002). Of note, nicotine alone applied by patch failed to reproduce these results (Dua et al., 2009), showing the importance to study the effect of complete cigarette smoke. To our knowledge, the only assessment of the effects of postnatal ETS exposure on NNS was performed by our group in lambs

and showed a reduction in NNS frequency immediately following laryngeal stimulation by liquids (St-Hilaire et al., 2010). The effects of early postnatal ETS exposure on NNS occurring spontaneously, out of the LCR, is totally unknown.

The main objective of the present study was to test the hypothesis that postnatal ETS exposure in the first 15 days of life alters spontaneous NNS frequency and NNS-breathing coordination.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Animals

Eighteen mixed-bred lambs were involved in the study. All lambs were born at term by spontaneous vaginal delivery at our local provider's farm and housed in our animal quarters from day one of life until the end of the experiments. The study protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Care and Experimentation of our institution.

### 2.2. Environmental tobacco smoke exposure

The lambs (6 per group) were exposed to secondary tobacco smoke and randomly exposed to either fresh air (C0 group) or 10 cigarettes/day (C10 group) or 20 cigarettes/day (C20 group) for the first 15 days of life. The 8-h daily exposure consisted of two periods of 4h separated by a 30-min pause at noon for bottle-feeding. Before and after exposure, the lambs were bottle-fed, the body temperature and weight measured, and a blood sample was collected for arterial blood gas measurement. A urine sample was also collected for cotinine and creatinine measurement on days 14 and 15 (U-Bag for newborn, Libertyville, IL, USA).

An automatic, custom-made cigarette-smoking machine (Duvareille et al., 2010) was used to expose the lambs to a mixture of mainstream, exhaled mainstream and side stream smoke. The machine was preset at 2 s puff duration, 35 ml puff volume, according to ISO 3308 norms, with a 30 s interval between 2 puffs. The most popular cigarette brand in Quebec at the time of the study (*Peter Jackson King size*) was used. Environmental tobacco smoke was delivered to a vented 1.2 X 1.2 m Plexiglas exposure chamber where non-restrained lambs were housed by pair and stayed for the duration of the exposure (Duvareille et al., 2010). Following the 15-day exposure, a 6-h polysomnographic recording was performed in each lamb. Lambs were euthanized at the end of the recording.

### **2.3. Surgical preparation**

At day one of life, a catheter was placed under local anesthesia in the brachial artery for arterial blood gas measurements. Aseptic surgery was performed at day 12 of life under general anesthesia, as previously described (St-Hilaire et al., 2010). Briefly, chronic instrumentation included placement of bipolar electrodes into the thyroarytenoid muscles (electromyographic TA activity; a glottal adductor) for recording swallowing activity, into the parietal cortex for electrocorticogram (ECog) recording and under the periosteum of the 5<sup>th</sup> rib for electrocardiogram (ECG) recording. Leads from all electrodes were subcutaneously tunneled to exit on the back of the lamb. Correct electrode positioning was systematically verified at autopsy.

### **2.4. Recording equipment**

The above chronic instrumentation was completed immediately prior to the polysomnographic recording performed on day 16 without sedation. Needle electrodes were inserted subcutaneously near the right eye socket for electrooculogram (EOG) recording. Respiratory inductance plethysmography was used to monitor respiratory thoraco-abdominal movements. In order to obtain data from prolonged recording (with periods of wakefulness and sleep) in freely-moving, non-sedated lambs, we used our custom-made radiotelemetry system (Samson et al., 2012). The telemetry transmitter was connected to the electrode leads and housed in the lamb's jacket. The raw EMG signals were rectified, integrated and averaged (moving time average = 100 ms). Polysomnographic signals were recorded on a PC, using the MP100A data acquisition system and Acqknowledge software (version 3.7.3, Biopac Systems Inc., Santa Barbara, CA, USA).



## **2.5. Data analysis**

### **2.5.1. Baseline data and laryngeal inflammation**

Weight and arterial blood gases were averaged daily for each group of lambs throughout the study. Arterial blood gases were corrected for lamb temperature (Andritsch et al., 1981). Urinary cotinine was measured using an ELISA immunoassay kit (Bio-Quant COTININE Direct Elisa, San Diego, CA) and urinary creatinine was assayed in the Department of Biochemistry, Sherbrooke University Hospital, as previously described (Duvareille et al., 2010). Cotinine/creatinine ratio was calculated on days 14 and 15. Finally, laryngeal inflammation was graded for epithelial and subepithelial changes, as previously reported (Carreau et al., 2011).

### **2.5.2. States of alertness**

Standard electrophysiological and behavioral criteria were used to define wakefulness (W), quiet sleep (QS), active sleep (AS) and arousals (Renolleau et al., 1999). Percentage of time spent in each state of alertness was calculated, as well as the arousal index (number by hour).

### **2.5.3. Cardiorespiratory parameters**

Respiratory and heart rates were calculated for each state of alertness during 60 seconds of stable breathing and then averaged. Apneas were defined as two “missed” breaths, compared to the two preceding respiratory cycles, and sighs were defined as a twofold increase in amplitude of the respiratory inductance plethysmography signal. Apnea and sigh indexes per hour were calculated in the three states of alertness.

#### 2.5.4. Non-nutritive swallowing and non-nutritive breathing coordination

Non-nutritive swallowing activity was recognized by a brief, high amplitude TA EMG burst with interruption of nasal airflow, as previously validated (Reix et al., 2003). Total NNS frequency and percentage were calculated for QS, AS and periods of quiet wakefulness. Non-nutritive swallows were then separated into isolated NNS and NNS occurring in burst, defined as  $\geq 2$  NNS within 4 seconds (Duvareille et al., 2007). Then, using the sum signal of the respiratory inductance plethysmography and nasal airflow traces, analysis of NNS-breathing coordination was performed on all isolated swallows preceded and followed by at least two quiet breathing cycles without NNS. In order to provide a complete assessment of the effect of ETS on NNS breathing coordination, two different but complementary analyses were performed.

#### 2.5.6. Categorical assessment of NNS-breathing coordination

Isolated NNS were classified as e-type NNS (preceded by and followed by expiration), ei-type NNS (at the transition from expiration to inspiration), ie-type NNS (at the transition from inspiration to expiration) or i-type NNS (preceded by and followed by inspiration) (Reix et al., 2003). NNS frequency per hour was then calculated for each type of NNS, in each state of alertness for each exposure condition. Furthermore, the percentage of each NNS type was calculated for each state of alertness and exposure condition.

#### 2.5.7. NNS-breathing phase calculation

The goal of this analysis is to provide a quantitative assessment of the timing (phase) of NNS within the breathing cycle, hence attempting to give a more thorough analysis of the NNS-breathing coordination than the categorical assessment. In the present study, the non-calibrated, sum signal provided by the respiratory inductive plethysmography was used for all measurements. The

analysis has been described in detail elsewhere (McFarland and Lund, 1993). The duration from the beginning of the co-occurring breathing cycle to NNS onset is first measured. Because swallowing can perturb the co-occurring cycle, this duration measure is expressed as a percentage of the total duration of the immediately preceding control breathing cycle. In this way, phase is normalized to total control cycle duration. NNS-breathing phase value may range from 0% to 100%, with 0% being the beginning of inspiration of the control cycle and 100% being the end of expiration of the control cycle. Swallows occurring during a prolongation of the NNS co-occurring cycle that goes beyond control cycle duration, including during an expiratory pause, are classified as 100% +.

## **2.6. Statistical analyses**

All results were expressed as mean (SD) in each lamb and for each state of alertness. Statistical analyses were performed on raw data for all variables. Normality was tested using the Shapiro-Wilk test. The effect of ETS on baseline values (weight gain, blood gases, cotinine/creatinine ratio) was assessed by the Kruskal-Wallis test. All other variables were analyzed through either a general linear model 2-way or 3-way ANOVA for repeated measures using Proc mixed of the SAS software (version 9.1.3, Cary, NC) with group exposure, states of alertness and NNS type as the independent variables. Differences were deemed significant if  $p < 0.05$ . In addition, given the relatively small number of studied lambs (related both to the complexity of the ovine model and ethical constraints), it was decided to give full consideration to the presence of a significant trend, defined as  $p < 0.1$ .

### **3. RESULTS**

#### **3.1. Baseline values and laryngeal inflammation**

All lambs tolerated the 15 days ETS exposure without any problems. In particular, no cough, nose secretion or fever was observed. Mean urinary cotinine/creatinine ratio on days 14 and 15 were significantly higher in ETS exposed lambs, in relation to the number of cigarettes smoked per day ( $p = 0.005$ , see table 1 for details). Mean weight gain was identical in the three groups ( $p = 0.4$ , table 1). Results for arterial blood gas values and hemoglobin saturation in  $O_2$  are shown in table 1 and reveal no significant differences for any variables between exposure groups. Finally, no significant laryngeal epithelial or subepithelial inflammation was observed in the exposure groups (C10: mean score = 1.8/15; C20: mean score = 0.5/15) compared to control lambs (mean score = 0/15).

**Table 1: Baseline data following a 15-days postnatal cigarette smoke exposure.**

	C0	C10	C20	p values
<b>Cotinine/creatinine</b>				
<b>Weight gain (g.day<sup>-1</sup>)</b>	134 (50)	161 (40)	128 (54)	<b>p = 0.4</b>
<b>PaO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	89 (8)	92 (10)	94 (80)	<b>p = 0.6</b>
<b>PaCO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	45 (5)	44 (4)	41 (10)	<b>p = 0.5</b>
<b>pH</b>	7.37 (0.05)	7.40 (0.04)	7.39 (0.07)	<b>p = 0.4</b>
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mmole.l<sup>-1</sup>)</b>	24 (2)	26 (3)	24 (2)	<b>p = 0.4</b>
<b>Hemoglobin saturation in O<sub>2</sub> (%)</b>	96 (3)	97 (1)	97 (1)	<b>p = 0.9</b>

C0: control lambs exposed to air, n = 6; C10: lambs exposed to 10 cigarettes per day, n = 6; C20: lambs exposed to 20 cigarettes per day, n = 6.

### 3.2. Sleep architecture

Sleep architecture is reported in table 2 for the 3 groups. Though not quantified, an increase in spontaneous activity during wakefulness was noted in C10 and especially C20 lambs. Overall, ETS had no significant influence on the % time spent in W, QS and AS, arousal index and mean sleep state duration.

**Table 2: Sleep architecture following a 15-days postnatal exposure to environmental tobacco smoke**

	<b>C0</b>	<b>C10</b>	<b>C20</b>	<b>p values</b>
<b>Total recording duration (Hr)</b>	3.8 (0.2)	3.9 (0.4)	4.0 (0.3)	<b>p = 0.3</b>
<b>% time W</b>	51 (10)	52 (8)	47 (12)	
<b>% time QS</b>	42 (10)	40 (8)	45 (11)	
<b>% time AS</b>	7 (3)	8 (4)	8 (3)	
<b>Arousal index (h<sup>-1</sup>)</b>				<b>p = 0.9</b>
<b>QS</b>	24 (4)	24 (5)	24 (8)	
<b>AS</b>	50 (16)	41 (20)	35 (7)	
<b>Mean epoch duration (s)</b>				<b>p = 0.3</b>
<b>W</b>	169 (43)	179 (62)	147 (37)	
<b>QS</b>	154 (29)	157 (31)	166 (57)	
<b>AS</b>	78 (24)	105 (41)	108 (22)	

W: wakefulness; QS: quiet sleep; AS: active sleep. %time W, QS, AS: percentage of recording time spent in wakefulness, quiet and active sleep.

### 3.3. Cardiorespiratory variables

Data for cardiorespiratory variables are reported in Table 3. Whatever the state of alertness, ETS had no influence on respiratory and heart rates, as well as sigh index or apnea index and duration. Most apneas were post-sigh apneas.

**Table 3: Cardiorespiratory data in lambs after postnatal exposure to environmental tobacco smoke for 15 days**

	C0	C10	C20	p values
<b>RR: Resp. Rate (min<sup>-1</sup>)</b>				
W	40 (8)	45 (13)	41 (7)	
QS	37 (8)	40 (11)	34 (7)	<b>p = 0.6</b>
AS	42 (13)	44 (12)	38 (6)	
<b>HR: Heart Rate (min<sup>-1</sup>)</b>				
W	184 (35)	190 (16)	191 (19)	
QS	183 (34)	192 (19)	195 (19)	<b>p = 0.7</b>
AS	169 (34)	174 (19)	184 (26)	
<b>Apnea index (h<sup>-1</sup>)</b>				
W	8 (4)	10 (3)	11 (4)	
QS	2 (1)	3 (2)	2 (2)	<b>p = 0.2</b>
AS	6 (5)	10 (13)	6 (4)	
<b>Apnea duration (s)</b>				
W	7.5 (3.0)	7.9 (1.5)	8.4 (1.2)	
QS	8.6 (3.3)	8.0 (2.6)	9.7 (1.6)	<b>p = 0.2</b>
AS	6.2 (2.8)	4.5 (0.9)	7.4 (2.4)	
<b>Sigh index (h<sup>-1</sup>)</b>				
W	43 (22)	28 (19)	33 (20)	
QS	5 (2)	6 (2)	4 (3)	<b>p = 0.5</b>
AS	21 (18)	6 (5)	13 (13)	

### 3.4. Non-nutritive swallowing activity

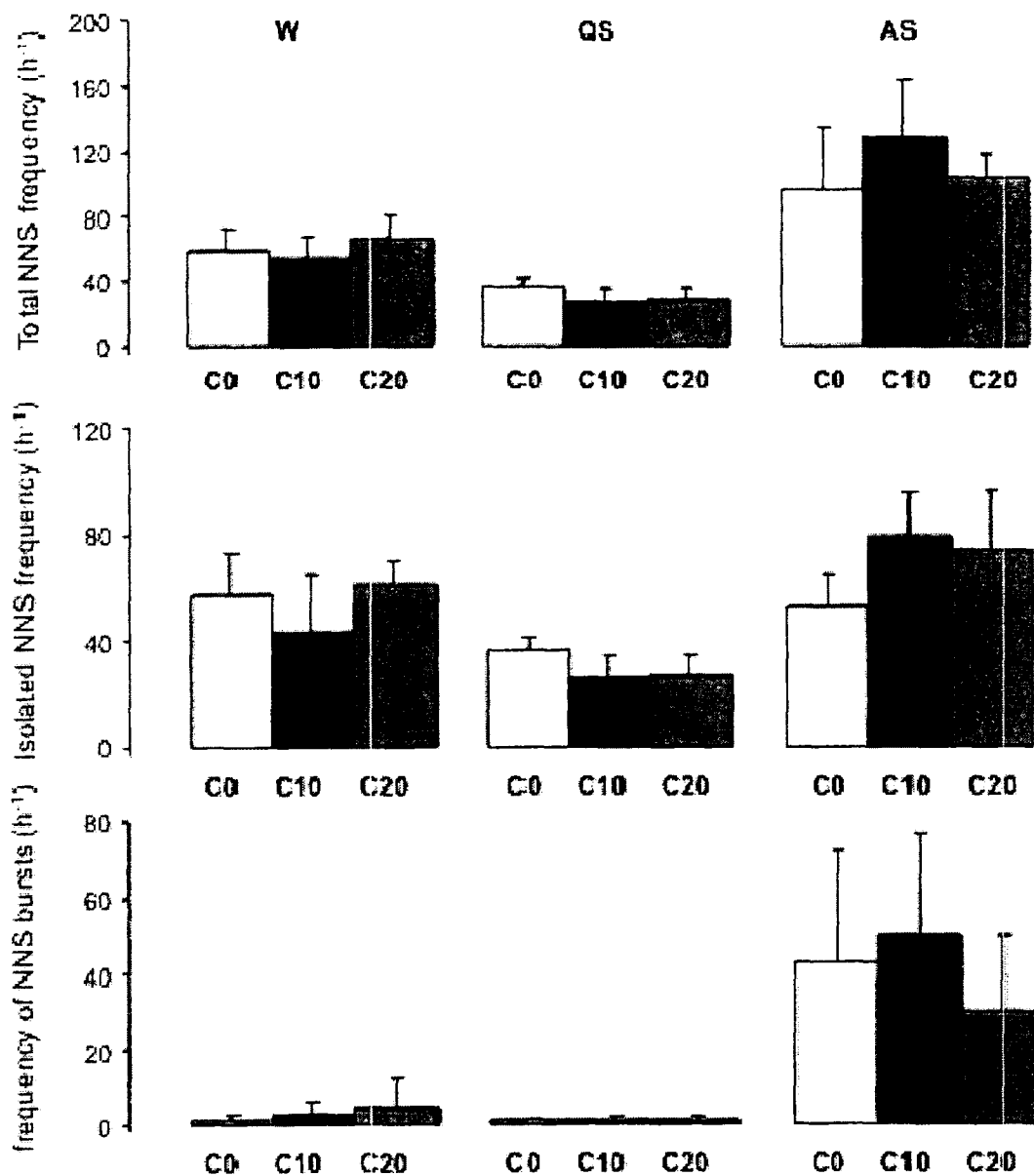
NNS frequency data are reported in figure 1. Regardless of the exposure, NNS frequencies (isolated and burst) were greater in AS than W and QS. In addition, whatever the state of alertness, ETS had no effect on the frequency of total ( $p = 0.9$ ) and isolated ( $p = 0.9$ ) NNS, as well as NNS bursts ( $p = 0.6$ ).

### 3.5. NNS-breathing coordination

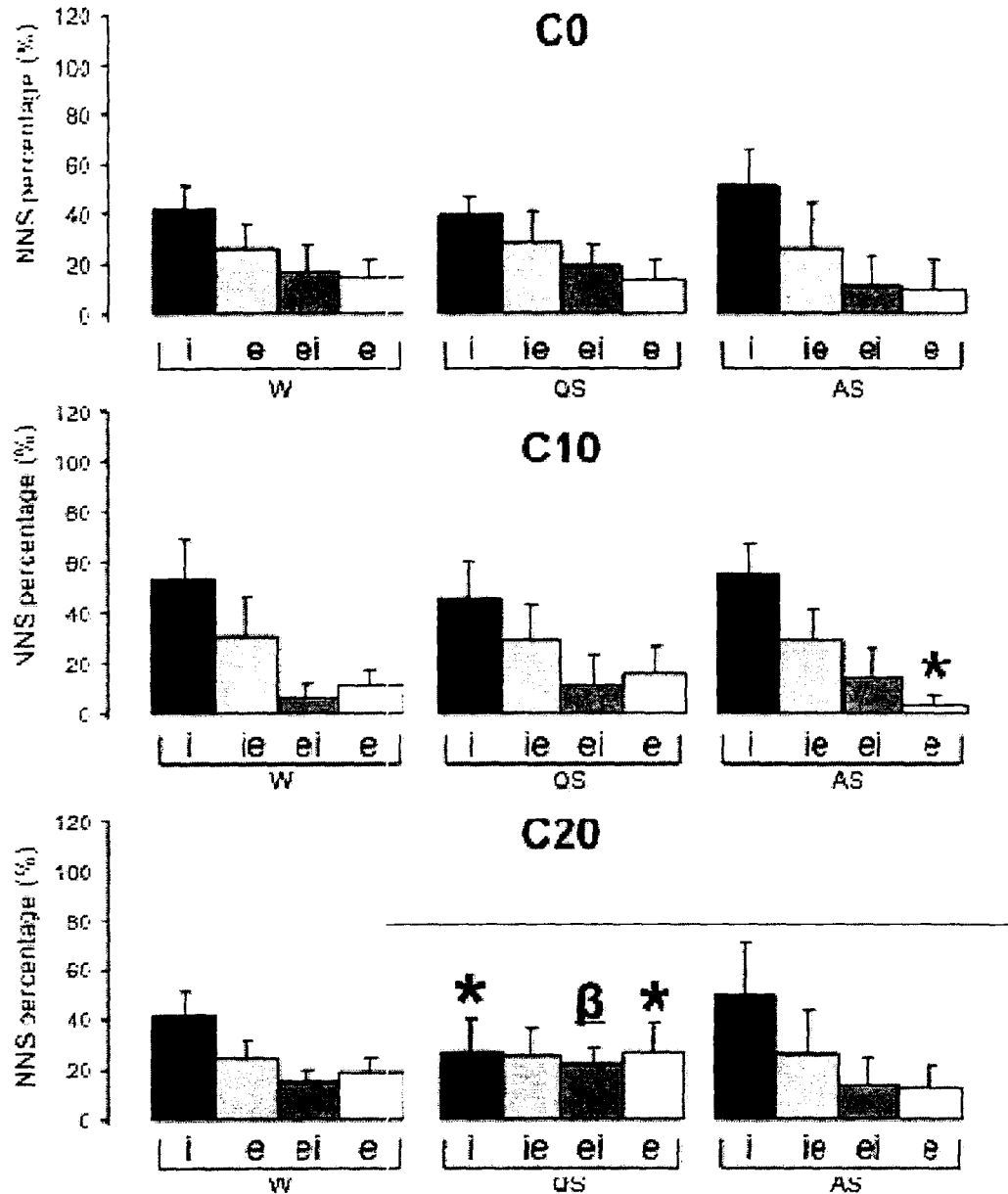
Results on NNS breathing coordination are reported in figure 2. Whatever the exposure, the same overall pattern of NNS-breathing coordination was observed, with  $ii > ie > ei > ee$ -NNS types. However, in QS i-type NNS tended to decrease in C20 lambs compared to control ( $p = 0.07$ ), whereas ee and ei-type NNS were increased in C20 lambs when compared respectively to control ( $p = 0.07$ ) and C10 lambs ( $p = 0.02$ ). Furthermore, a decrease in ee-type NNS in AS was noted between C10 and C0 lambs ( $p = 0.06$ ). Finally, no differences were noted between exposure groups using the NNS-breathing phase calculation analysis (C0: 49% vs. C20: 52%  $p = 0.9$ ).

Of note, identical overall statistical results were observed when C10 and C20 were pooled as the exposed group compared to the unexposed, control group.





**Figure 1:** Effect of cigarette smoke exposure on the frequency of total non-nutritive swallowing (NNS), isolated NNS and NNS bursts in control lambs (C0, exposure to air), lambs exposed to 10 cigarettes (C10) or 20 cigarettes (C20) per day ( $n = 6$  for each group) in each state of alertness. W, wakefulness; QS, quiet sleep; AS, active sleep. There were no statistically significant differences between groups or states of alertness.



**Figure 2:** Effects of cigarette smoke exposure on NNS-breathing coordination in each state of alertness in C0, C10 and C20 groups ( $n = 6$  for each group). iNNS, NNS beginning and ending in inspiration; eNNS, NNS beginning and ending in expiration; ieNNS, NNS beginning in inspiration and ending in expiration; eiNNS, NNS beginning in expiration and ending in inspiration. Results are expressed in percentage of the total number of NNS. \*: significant difference vs. C0;  $\beta$ : significant difference C10 vs. C20. Underlined symbols indicate  $p < 0.05$ , normal font symbols indicate  $p < 0.1$ . The same pattern of NNS-breathing coordination was observed between groups exposed to cigarette smoke or not, with  $i > ie > ei > e$  NNS types.

## 4. DISCUSSION

Results from the present study show for the first time that postnatal ETS exposure for the first 15 days of life does not have any significant effects on baseline heart and respiratory rates, sleep architecture and non-nutritive swallowing frequency in newborn lambs. However, in support of our hypothesis, NNS-breathing coordination tends to be altered.

The effects of tobacco exposure on neonatal cardiorespiratory function have been previously assessed in a number of animal studies, including in newborn rats and lambs (Bamford et al., 1996; Hafstrom et al., 2002). While alterations in cardiorespiratory function and sleep have been reported, most studies used very high levels of nicotine exposure ( $> 1$  mg/kg/day), which is likely irrelevant to the human newborn exposure (Hussein et al., 2006). In addition, animal studies were mostly focused on the effects of nicotine alone, though cigarette smoke contains around 4000 different chemical products, from which more than 100 are toxic and harmful for human health. In the present study, our custom-built smoking machine (Duvareille et al., 2010) was used to mimic postnatal ETS exposure and ensure a urinary cotinine level at the upper limit of the range measured in newborn infants exposed to ETS at home (Blackburn et al., 2005; Joseph et al., 2007), thus ensuring real-life relevance of our results.

### 4.1. Baseline values and laryngeal inflammation

The normal weight gain observed throughout the 15 days ETS exposure in the present study confirms similar observations in a previous study by our group (St-Hilaire et al., 2010). Of note, longer ETS exposure (32 weeks) has been reported to reduce weight gain in mice (Talukder et al., 2011).

In the present study, a 15 days postnatal ETS exposure did not induce any observable laryngeal inflammation histologically. This is in agreement with a previous study in mice showing no increase in neutrophil accumulation and pro-inflammatory chemokine levels in the nasal turbinate tissue following a 24 weeks

ETS exposure (Huvenne et al., 2010). In contrast, several previous studies have reported that both ETS and active smoking (periods of 20 minutes to 24 weeks) induced laryngeal and supraglottic mucosa inflammation in adult human and mice (Ben Gamra et al., 2007; Huvenne et al., 2010). The reason for the discrepant results from one study to another is unknown.

#### **4.2. Sleep architecture and arousal**

In the present study, no effect of ETS was observed on sleep architecture. Sleep disturbances, including insufficient sleep, have been reported in active, chronic adult smokers (Davila et al., 2010). In human infants, while prenatal exposure to tobacco smoke did not modify sleep architecture (Dahlström et al., 2008; Horne et al., 2004), a decrease in both spontaneous arousals and arousal responses to obstructive apneas, hypoxia and trigeminal or auditory stimulation has been reported (Horne et al., 2004; Richardson et al., 2009; Tirosh and Libon, 1996). In addition, studies in lambs have shown that prenatal plus postnatal nicotine exposure blunts the arousal response to hypoxia (Hafstrom et al., 2000, 2002), while a 15 days postnatal ETS exposure blunts the arousal response observed during laryngeal chemoreflexes (St Hilaire et al., 2010). Overall, available results suggest that while perinatal ETS exposure does not alter the overall sleep architecture, prenatal and/or postnatal ETS exposure can blunt the arousal responses to various stimuli.

#### **4.3. Cardiorespiratory effects**

In agreement with the present observations, previous reports have shown that HR is not affected by perinatal ETS exposure, including prenatal + postnatal nicotine exposure in mice (Bamford et al., 1996; Schuen et al., 1997), prenatal ETS exposure in human infants (Tirosh et al., 1996; Viskari-Lähdeoja et al., 2008) and postnatal nicotine exposure in lambs (Hafström et al., 2000).

Prenatal exposure to nicotine in animals (lambs or rats) and ETS exposure in humans led to variable (no change or increase) effects on RR (Bamford et al., 1996; Hafström et al., 2002; Huang et al., 2004; Schuen et al., 1997; Stéphan-

Blanchard et al., 2010), maybe as a reflection of the variably blunted prenatal lung development (Maritz and Harding, 2011). No effects on RR were observed after postnatal nicotine exposure in lambs (Hafström et al., 2000), in agreement with our findings in the present study.

The absence of effect of 15 days postnatal ETS exposure on arterial blood gases and acid-base balance is in agreement with previous results obtained after prenatal plus postnatal nicotine exposure in lambs (Hafström et al., 2000, 2002), as well as after prenatal ETS exposure in term and preterm human infants for hemoglobin oxygen saturation (Stéphan-Blanchard et al., 2010, Tirosh et al., 1996).

Human studies on the effect of prenatal ETS exposure on apneas have yielded contradictory results, including no effect in term and preterm infants (Stéphan-Blanchard et al., 2010; Tirosh et al., 1996) or an increase in frequency and duration of obstructive (Balaguer et al., 2009) or central (Toubas et al., 1986) apneas. Our present observations show for the first time an absence of effect of postnatal ETS exposure on spontaneous apneas.

Of note, we have previously reported that 15 days postnatal ETS exposure enhances the cardiorespiratory inhibition observed as part of the laryngeal chemoreflexes in lambs (St-Hilaire et al., 2010), providing evidence of a deleterious cardiorespiratory effect of postnatal ETS exposure in lambs, which does not manifest in baseline conditions but appears when the autonomic system of the lambs is challenged.

#### **4.4 Non-nutritive swallowing frequency**

As reminded in the Introduction section, the reason to target NNS and NNS-breathing coordination in the present study was related to the crucial importance of this function to prevent lung aspiration of liquids secreted by the upper airways as well as part of the pharyngo-laryngeal refluxes, which are particularly frequent in the postnatal period. It has been previously proposed that anomalies of NNS may be involved in conditions such as apneas of prematurity, apparent life-threatening events of infants and sudden infant death syndrome (Praud, 2010). In this respect, the blunting effect of active smoking on various pharyngeal and laryngeal reflexes

in adult humans, including swallowing, provided further support for the hypothesis tested in the present study (Dua et al., 1998, 2009, 2011). In addition, previous data suggest that active cigarette smoking enhances gastro-esophageal reflux by altering closure of the upper (Dua et al., 1998) and lower (Kahrilas and Gupta, 1990) esophageal sphincter, together with inducing a delay in gastric emptying (Miller et al., 1989). The present observation that NNS frequency is unaltered by a 15 days postnatal ETS exposure in newborn lambs is similar to results on NNS frequency in active smokers at rest (Dua et al., 1998) and suggests that early postnatal ETS exposure should not increase the risk of saliva aspiration. However, our previous results showing a decreased number of NNS elicited during laryngeal chemoreflexes (St-Hilaire et al., 2010) suggest that NNS alterations by early postnatal ETS exposure might predispose to lung aspiration during acute challenges such as pharyngolaryngeal reflux. In this respect, it would be of interest to study the effects of postnatal ETS exposure on nutritive swallowing, which constitutes another challenge for swallowing function (Bernier et al., 2012).

#### **4.5. Non-nutritive swallowing-breathing coordination**

Non-nutritive swallowing and breathing share common upper airways structures and their central pattern generator are located in the same nuclei in the brainstem (Jean, 2001). Conceivably, any condition, which can alter the upper airways or the respiratory or swallowing centers, may influence NNS frequency and the precise NNS-breathing coordination. We have previously shown that NNS beginning in inspiration are predominant over NNS beginning in expiration in lambs (Reix et al., 2003). In addition, we have reported that NNS-breathing coordination in lambs is unaltered by various neonatal conditions such as nasal application of continuous or intermittent positive airway pressure (Samson et al., 2005), hypoxia (Duvareille et al., 2007), preterm birth (Reix et al., 2004), reflux laryngitis (Brisebois et al., 2010), suggesting that NNS-breathing coordination is set well before birth, in line with its importance for preventing both lung aspiration and respiratory inhibition. Until now, hypercapnia in newborn lambs (Duvareille et al., 2007) and volition in adult

humans (Kelly et al., 2007) are the only conditions known to alter NNS-breathing coordination. The present observation adds postnatal ETS, which tends to alter NNS-breathing coordination, especially by increasing expiratory NNS to the expense of inspiratory NNS in the C20 lambs compared to control lambs. However, the potential physiological and/or clinical importance of this alteration is unknown. Similarly, it is also unknown whether prenatal tobacco exposure might lead to even more deleterious effects on NNS-breathing coordination.

The absence of any laryngeal inflammation in lambs suggests that the potential mechanism responsible for altering NNS-breathing coordination is of central origin. Previous studies have reported that perinatal ETS exposure leads to anomalies of neuronal network development in regions of the brainstem involved in respiratory and swallowing control. Examples include anomalies of nicotinic, GABAergic and serotonergic receptors (Duncan et al., 2009) and microglial inflammation by NNK[4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone] leading to neuronal destruction (Gosh et al., 2009).

## **5. CONCLUSION**

In conclusion, postnatal ETS exposition in newborn lambs did not affect sleep, respiration, cardiac activity and NNS frequency, but tended to alter NNS-breathing coordination during QS. Though the potential consequences of this alteration are unknown, it adds to our previous observation of a decreased swallowing activity during laryngeal chemoreflexes and supports an effect of postnatal ETS exposure on swallowing function.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Jean-Philippe Gagné and the statistical assistance of Julie Hamon.

The experiments were supported by the Canadian Institutes of Health Research, the Canadian Foundation for Innovation and the Foundation of Stars. Jean-Paul Praud is the holder of the Tier 1 Canada Research Chair in Neonatal Respiratory Physiology and a member of the Centre de Recherche Clinique Etienne-Le Bel du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke.



## **REFERENCES**

- Adgent, M.A., 2006. Environmental tobacco smoke and sudden infant death syndrome: a review. *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* 77, 69-85.
- Anderson, H.R., Cook, D.G., 1997. Passive smoking and sudden infant death syndrome: review of the epidemiological evidence. *Thorax* 52, 1003-1009.
- Bernier, A., Catelin, C., Hadj Ahmed, M.A., Samson, N., Bonneau, P., Praud, J.P.; 2012. Effects of nasal continuous positive airway pressure on nutritive swallowing in lambs. *J. Appl. Physiol.* In press
- Balaguer, C., Palou, A., Alonso-Fernandez, A., 2009. Smoking and sleep disorders. *Arch. Bronconeumol.* 45, 449-458.
- Bamford, O.S., Schuen, J.N., Carroll, J.L., 1996. Effect of nicotine exposure on postnatal ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia. *Respir. Physiol.* 106, 1-11.
- Ben Gamra, O., Mbarek, C., Charfi, S., Ouni, H., Hariga, I., Chedly, A., Zribi, S., El Khedim, A., 2007. Chronic laryngitis in adults. *Tunis. Med.* 85, 641-643.
- Blackburn, C.M., Bonas, S., Spencer, N.J., Coe, C.J., Dolan, A., Moy, R., 2005. Parental smoking and passive smoking in infants: fathers matter too. *Health Educ. Res.* 20, 185-194.
- Bottorff, J.L., Johnson, J.L., Irwin, L.G., Ratner, P.A., 2000. Narratives of smoking relapse: the stories of postpartum women. *Res. Nurs. Health* 23, 126-134.
- Brisebois, S., Samson, N., Fortier, P.H., Doueik, A.A., Carreau, A.M., Gagné, J.P., Praud, J.P., 2010. Effect of reflux laryngitis on non-nutritive swallowing in newborn lambs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 181, A2441.
- Carreau, A.M., Patural, H., Samson, N., Doueik, A.A., Hamon, J., Fortier, P.H., Praud, J.P., 2011. Effects of simulated reflux laryngitis on laryngeal chemoreflexes in newborn lambs. *J. Appl. Physiol.* 111, 400-406.
- Dahlstrom, A., Ebersjo, C., Lundell, B., 2008. Nicotine in breast milk influences heart rate variability in the infant. *Acta Paediatr.* 97, 1075-1079.
- Davila, E.P., Lee, D.J., Fleming, L.E., LeBlanc, W.G., Arheart, K., Dietz, N., Lewis, J.E., McCollister, K., Caban-Martinez, A., Bandiera, F., 2010. Sleep disorders and secondhand smoke exposure in the U.S. population. *Nicotine Tob. Res.* 12, 294-299.
- Dua, K., Bardan, E., Ren, J., Sui, Z., Shaker, R., 2002. Effect of chronic and acute cigarette smoking on the pharyngoglottal closure reflex. *Gut* 51, 771-775.

- Dua, K., Bardan, E., Ren, J., Sui, Z., Shaker, R., 1998. Effect of chronic and acute cigarette smoking on the pharyngo-upper oesophageal sphincter contractile reflex and reflexive pharyngeal swallow. *Gut* 43, 537-541.
- Dua, K., Surapaneni, S.N., Kuribayashi, S., Hafeezullah, M., Shaker, R., 2011. Protective role of aerodigestive reflexes against aspiration: study on subjects with impaired and preserved reflexes. *Gastroenterology* 140, 1927-1933.
- Dua, K.S., Surapaneni, S.N., Santharam, R., Knuff, D., Hofmann, C., Shaker, R., 2009. Effect of systemic alcohol and nicotine on airway protective reflexes. *Am. J. Gastroenterol.* 104, 2431-2438.
- Duncan, J.R., Garland, M., Myers, M.M., Fifer, W.P., Yang, M., Kinney, H.C., Stark, R.I., 2009. Prenatal nicotine-exposure alters fetal autonomic activity and medullary neurotransmitter receptors: implications for sudden infant death syndrome. *J. Appl. Physiol.* 107, 1579-1590.
- Duvareille, C., Beaudry, B., St-Hilaire, M., Boheimier, M., Brunel, C., Micheau, P., Praud, J.P., 2010. Validation of a new automatic smoking machine to study the effects of cigarette smoke in newborn lambs. *Lab. Anim.* 44, 290-297.
- Duvareille, C., Lafrance, M., Samson, N., St-Hilaire, M., Pladys, P., Micheau, P., Bournival, V., Langlois, C., Praud, J.P., 2007. Effects of hypoxia and hypercapnia on nonnutritive swallowing in newborn lambs. *J. Appl. Physiol.* 103, 1180-1188.
- Gosh, D., Mishra, M.K., Das, S., Kaushik, D.K., Basu, A., 2009. Tobacco carcinogen induces microglial activation and subsequent neuronal damage. *J. Neurochem.* 110, 1070-1081.
- Hafstrom, O., Milerad, J., Asokan, N., Poole, S.D., Sundell, H.W., 2000. Nicotine delays arousal during hypoxemia in lambs. *Pediatr. Res.* 47, 646-652.
- Hafstrom, O., Milerad, J., Sundell, H.W., 2002. Altered breathing pattern after prenatal nicotine exposure in the young lamb. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 92-97.
- Hafstrom, O., Milerad, J., Sundell, H.W., 2002. Prenatal nicotine exposure blunts the cardiorespiratory response to hypoxia in lambs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 1544-1549.
- Horne, R.S., Franco, P., Adamson, T.M., Groswasser, J., Kahn, A., 2004. Influences of maternal cigarette smoking on infant arousability. *Early Hum. Dev.* 79, 49-58.
- Huang, Y.H., Brown, A.R., Cross, S.J., Cruz, J., Rice, A., Jaiswal, S., Fregosi, R.F., 2010. Influence of prenatal nicotine exposure on development of the ventilatory response to hypoxia and hypercapnia in neonatal rats. *J. Appl. Physiol.* 109, 149-158.

- Hussein, J., Farkas, S., MacKinnon, Y., Ariano, R.E., Sitar, D.S., Hasan, S.U., 2007. Nicotine dose-concentration relationship and pregnancy outcomes in rat: biologic plausibility and implications for future research. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 218, 1-10.
- Huvenne, W., Perez-Novo, C.A., Derycke, L., De Ruyck, N., Krysko, O., Maes, T., Pauwels, N., Robays, L., Bracke, K.R., Joos, G., Brusselle, G., Bachert, C., 2010. Different regulation of cigarette smoke induced inflammation in upper versus lower airways. *Respir. Res.* 11, 100.
- Jean, A., 2001. Brain stem control of swallowing: neuronal network and cellular mechanisms. *Physiol. Rev.* 81, 929-969.
- Joseph, D.V., Jackson, J.A., Westaway, J., Taub, N.A., Petersen, S.A., Wailoo, M.P., 2007. Effect of parental smoking on cotinine levels in newborns. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 92, F484-488.
- Kahrilas, P.J., Gupta, R.R., 1990. Mechanisms of acid reflux associated with cigarette smoking. *Gut* 31, 4-10.
- Kelly, B.N., Huckabee, M.L., Jones, R.D., Frampton, C.M., 2006. Nutritive and non-nutritive swallowing apnea duration in term infants: implications for neural control mechanisms. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 154, 372-378.
- Kelly, B.N., Huckabee, M.L., Jones, R.D., Carroll, G.J., 2007. The influence of volition on breathing-swallowing coordination in healthy adults. *Behav. Neurosci.* 121, 1174-1179.
- Kelly, B.N., Huckabee, M.L., Frampton, C.M., Jones, R.D., 2008. Arousal has no effect on non-nutritive breathing-swallowing coordination during the first year of human life. *Int. J. Dev. Neurosci.* 26, 385-390
- Liebrechts-Akkerman, G., Lao, O., Liu, F., van Sleuwen, B.E., Engelberts, A.C., L'hoir, M.P., Tiemeier, H.W., Kayser, M., 2011. Postnatal parental smoking: an important risk factor for SIDS. *Eur. J. Pediatr.* 170, 1281-1291.
- Maritz, G.S., Harding, R., 2011. Life-long programming implications of exposure to tobacco smoking and nicotine before and soon after birth: evidence for altered lung development. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 8, 875-898.
- McFarland, D.H., Lund, J.P., 1993. An investigation of the coupling between respiration, mastication, and swallowing in the awake rabbit. *J. Neurophysiol.* 69, 95-108.
- Miller, G., Palmer, K.R., Smith, B., Ferrington, C., Merrick, M.V., 1989. Smoking delays gastric emptying of solids. *Gut* 30, 50-53.
- Mitchell, E.A., Milerad, J., 2006. Smoking and the sudden infant death syndrome. *Rev. Environ. Health* 21, 81-103.

- Nixon, G.M., Charbonneau, I., Kermack, A.S., Brouillette, R.T., McFarland, D.H., 2008. Respiratory-swallowing interactions during sleep in premature infants at term. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 160, 76-82.
- Praud, J.P., 2010. Upper airway reflexes in response to gastric reflux. *Paediatr. Respir. Rev.* 11, 208-212.
- Reix, P., Arsenault, J., Langlois, C., Niyonsenga, T., Praud, J.P., 2004. Nonnutritive swallowing and respiration relationships in preterm lambs. *J. Appl. Physiol.* 97, 1283-1290.
- Reix, P., Fortier, P.H., Niyonsenga, T., Arsenault, J., Letourneau, P., Praud, J.P., 2003. Non-nutritive swallowing and respiration coordination in full-term newborn lambs. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 134, 209-218.
- Richardson, H.L., Walker, A.M., Horne, R.S., 2009. Maternal smoking impairs arousal patterns in sleeping infants. *Sleep* 32, 515-521.
- Samson, N., St-Hilaire, M., Nsegbe, E., Reix, P., Moreau-Bussiere, F., Praud, J.P., 2005. Effect of nasal continuous or intermittent positive airway pressure on nonnutritive swallowing in the newborn lamb. *J. Appl. Physiol.* 99, 1636-1642.
- Samson, N., Dumont, S., Specq, M.L., Praud, J.P., 2011. Radio telemetry devices to monitor breathing in non-sedated animals. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 179, 111-118.
- Schuen, J.N., Bamford, O.S., Carroll, J.L., 1997. The cardiorespiratory response to anoxia: normal development and the effect of nicotine. *Respir. Physiol.* 109, 231-239.
- Stephan-Blanchard, E., Chardon, K., Leke, A., Delanaud, S., Djeddi, D., Libert, J.P., Bach, V., Telliez, F., 2010. In utero exposure to smoking and peripheral chemoreceptor function in preterm neonates. *Pediatrics* 125, e592-e599.
- St-Hilaire, M., Duvareille, C., Avoine, O., Carreau, A.M., Samson, N., Micheau, P., Doueik, A., Praud, J.P., 2010. Effects of postnatal smoke exposure on laryngeal chemoreflexes in newborn lambs. *J. Appl. Physiol.* 109, 1820-1826.
- Talukder, M.A., Johnson, W.M., Varadharaj, S., Lian, J., Kearns, P.N., El-Mahdy, M.A., Liu, X., Zweier, J.L., 2011. Chronic cigarette smoking causes hypertension, increased oxidative stress, impaired NO bioavailability, endothelial dysfunction, and cardiac remodeling in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300, H388-H396.
- Thach, B.T., Menon, A., 1985. Pulmonary protective mechanisms in human infants. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131, S55-S58.
- Tirosh, E., Libon, D., Bader, D., 1996. The effect of maternal smoking during pregnancy on sleep respiratory and arousal patterns in neonates. *J. Perinatol.* 16, 435-438.

- Toubas, P.L., Duke, J.C., McCaffree, M.A., Mattice, C.D., Bendell, D., Orr, W.C., 1986. Effects of maternal smoking and caffeine habits on infantile apnea: a retrospective study. *Pediatrics* 78, 159-163.
- Viskari-Lahdeoja, S., Hytinantti, T., Andersson, S., Kirjavainen, T., 2008. Heart rate and blood pressure control in infants exposed to maternal cigarette smoking. *Acta Paediatr.* 97, 1535-1541.
- Wilson, S.L., Thach, B.T., Brouillette, R.T., Abu-Osba, Y.K., 1981. Coordination of breathing and swallowing in human infants. *J. Appl. Physiol.* 50, 851-858.

# **DISCUSSION**

## Chapitre 1 : Préambule à la discussion

La compréhension de la coordination déglutition-respiration a fait l'objet de nombreuses études durant les quarante dernières années, surtout pour les déglutitions nutritives (Miller, 2004), et dans une moindre mesure pour les déglutitions non-nutritives. Pour ces dernières, le but premier a bien sûr été de caractériser cette coordination chez l'être humain adulte (Nishino et al. 1985 ; Smith et al. 1989 ; Martin et al. 1994 ; Palmer et Hiiemae, 2003) ou nouveau-né (Nixon et al. 2008 ; Kelly et al. 2006), ainsi que dans différents modèles animaux expérimentaux tels que la chèvre (Feroah et al. 2002), la brebis (Roberge et al. 2007) et l'agneau né à terme (Reix et al. 2003) ou prématurément (Reix et al. 2004). Dans un deuxième temps, les différentes équipes de recherches impliquées dans le domaine ont tenté de déterminer si cette coordination était très robuste ou influençable par différents stress. L'hypothèse principale est qu'une condition donnée physiologique et/ou pathologique est capable de perturber la coordination DNN-respiration et favoriser les apnées (centrales et périphériques) et/ou les aspirations pulmonaires.

Ce projet de doctorat s'intègre donc directement dans la mise à l'épreuve de cette coordination déglutition-respiration par des stress respiratoires couramment rencontrés en période néonatale comme l'hypoxie, l'hypercapnie et l'exposition à la fumée de cigarette (FEC).

La discussion sera divisée en plusieurs parties :

- La première portera sur le choix du modèle animal ovin et sur les modèles expérimentaux eux-mêmes.
- La seconde discutera de l'influence de l'hypoxie/hypercapnie et de l'FEC sur la fréquence des DNN et sur la coordination DNN-respiration.
- La troisième discutera de la robustesse de la coordination DNN-respiration.
- La quatrième s'attardera sur l'importance des stades de conscience dans ces études en période néonatale.

- La cinquième partie mettra en perspective cette thèse en proposant d'autres projets et/ou idées pour poursuivre dans le domaine de la coordination déglutition-respiration en période néonatale.
- La sixième partie constituera la conclusion de cette thèse.



## **Chapitre 2 : Choix du modèle animal ovin et mise en place de deux modèles expérimentaux pour l'étude de l'exposition à l'hypoxie/hypercapnie et à la fumée de cigarette.**

### **I. Choix du modèle animal ovin :**

En parcourant les nombreux congrès internationaux et même à l'échelle nationale et provinciale sur le contrôle respiratoire, une question est toujours revenue tant pour moi que pour mes collègues de laboratoire à la maîtrise, au doctorat ou même stagiaires. Pourquoi avoir travaillé avec des agneaux nouveau-nés comme modèle animal et ne pas avoir utilisé des rats comme dans la majorité des laboratoires? Deux explications peuvent être avancées pour répondre à cette question. L'une est d'ordre physiologique et l'autre d'ordre expérimentale.

Mais avant de commencer à répondre correctement à cette question il est toujours nécessaire et important de rappeler que toutes les études composant cette thèse ont été approuvées par le comité d'éthique de l'université de Sherbrooke, en accord avec le conseil canadien de protection des animaux (CCPA).

La première réponse d'ordre physiologique réside dans la maturation du système cardiorespiratoire chez l'agneau incluant le système de contrôle. L'intérêt du modèle ovin réside dans la dynamique de cette maturation pré- et postnatale qui se rapproche plus de l'humain que des rongeurs (rat notamment) ; chez ces derniers, le système de contrôle cardiorespiratoire est plus proche de celui d'un nouveau-né prématuré. Le modèle ovin est le modèle animal le plus étudié en période fœtale (Kianicka et al. 1998 ; Bratu et al. 2004 ; Saada et al. 2010 ; Stathopoulos et al. 2010) et un des plus étudiés sur le plan cardiorespiratoire en période périnatale (pré et post). Ainsi, l'agneau reste à ce jour le modèle de référence pour l'étude de la physiologie cardiorespiratoire néonatale sans sédation sur animal entier et un modèle expérimental unique pour étudier les apnées du prématuré et les chémoréflexes laryngés. Il permet ainsi l'étude de l'ontogénèse du contrôle respiratoire de la période foetale à postnatale.

Cependant, le modèle murin largement développé reste le modèle de référence (gold standard) pour l'étude et la compréhension des centres respiratoires. En effets, les préparations in-vitro néonatales de tronc cérébral ont permis de cartographier les centres respiratoires dans le tronc cérébral de rat et de comprendre la rythmogénèse de la respiration. De plus, l'avènement de la microdialyse et des souris transgéniques a permis d'identifier les principaux neurotransmetteurs et neuromodulateurs centraux impliqués dans le contrôle respiratoire. Mais la maturation de la fonction cardiorespiratoire chez le modèle murin est dite « extrêmement rapide ». Ainsi, la première journée de vie correspond à un équivalent de trente semaines de maturation chez l'humain nouveau-né (Kingman, 2003), faisant que ce modèle reste plus adapté pour observer les conséquences d'une perturbation périnatale sur la fonction étudiée à l'âge adulte (Kinkead et al. 2009 ; Bairam et al. 2009 ; Dumont et Kinkead, 2010 ; Montandon et al. 2010).

La deuxième réponse d'ordre expérimental est liée au fait qu'en terme de recherche animale, le but ultime est de se rapprocher le plus possible de la physiologie dite "normale". Comprendre comment fonctionne une fonction physiologique comme la respiration par exemple se fait dans l'idéal chez un animal non stressé en condition de repos, non contentonné et si cela est aussi possible sans aucune sédation. L'utilisation de l'ovine dans notre laboratoire répond parfaitement à ces trois objectifs. De par sa taille, l'agneau nous permet d'installer sous anesthésie générale différentes électrodes, de façon à pouvoir étudier quelques jours plus tard la respiration et la déglutition par téléométrie chez un agneau sans sédation ni contention (technique mise en place et développée dans notre laboratoire : voir partie suivante). En effet, l'agneau, même prématuré, est un animal robuste capable de très bien supporter le stress d'une chirurgie complexe et invasive dans les régions laryngée, diaphragmatique et cérébrale sous anesthésie générale, avec une récupération étonnamment rapide. De plus, la capacité de l'agneau en bas âge à se lier émotionnellement aux expérimentateurs qui le nourrissent plusieurs fois par jour au biberon diminue grandement le stress auquel il est soumis dans les premiers jours de vie lors de la séparation maternelle. Ainsi, l'agneau est un animal plus doux, plus compliant lors des expérimentations que par exemple le cochonnet. Ce dernier, qui a aussi été utilisé à l'occasion comme modèle

d'étude de la prématurité (Rasch et al. 2010) reste un modèle très difficile sur le plan expérimental si non anesthésié (crie et s'agite plus facilement) et sa physiologie reste encore à ce jour moins bien connue que celle de l'agneau.

## **II. Mise en place des modèles expérimentaux :**

### **1) La télémétrie :**

Depuis les balbutiements de la recherche, l'enregistrement de paramètres physiologiques chez l'animal n'a pu s'affranchir de systèmes dits avec fils contraignant non seulement sur le plan physiologique mais aussi sur le plan éthique. En effet, nombre de recherches se sont faites sur des animaux anesthésiés ou alors restreints dans leurs mouvements, apportant un facteur externe de stress à l'étude de ces fonctions physiologiques mais aussi rendant très difficile la compréhension de la physiologie durant le sommeil qui s'en trouve perturbée (biais expérimental).

Depuis une vingtaine d'années, notre laboratoire a progressivement mis en place un système sans fil qui permet l'enregistrement polysomnographique des agneaux pour l'étude de la respiration durant le sommeil (Létourneau et al. 1999 ; Létourneau et Praud, 2003). L'équipement utilisé pour les études de cette thèse se compose d'un émetteur à 8 canaux qui communique par ondes radio FM avec un récepteur connecté à un ordinateur qui enregistre en temps réel les signaux physiologiques étudiés. Ainsi on peut brancher 4 EMG, 1 ECoG, 1 EOG, 1 ECG et un flux nasal en même temps sur l'émetteur.

Dans les études présentées dans cette thèse, les canaux servent à :

- EMG (Electromyogramme) : pour enregistrer l'activité musculaire des muscles laryngés (tels les 2 muscles thyroaryténoïdiens), du diaphragme et/ou de l'œsophage au besoin.

- EOG (Electro-oculogramme) : pour l'enregistrement des mouvements oculaires très important pour la détermination des stades de conscience (sommeil REM = « rapid eye movements »).
- ECoG (Electro-corticogramme) : pour l'enregistrement de l'activité du cortex cérébral essentielle dans la détermination des stades de conscience.
- ECG (Electrocardiogramme) : pour enregistrer l'activité électrique du cœur.
- Flux nasal : pour enregistrer le cycle respiratoire et détecter les apnées.

Avec les années, un autre système de radiotélémetrie a été mis au point et nous permet maintenant d'enregistrer la saturation en oxygène dans le sang artériel (Reix et al. 2005). Actuellement, le développement de la radiotélémetrie se poursuit dans le laboratoire, et les derniers prototypes utilisés chez l'agneau ont la possibilité de transmettre 12 signaux à fréquence rapide (EMG, EEG, EOG, ECG) et 8 signaux à fréquence plus lente (flux nasal, pression sanguine ou aérienne, mouvements respiratoire du thorax et de l'abdomen). De plus, un enregistrement vidéo est systématiquement ajouté, le tout étant acquis par le logiciel Aqcknowledge (Biopac Systems). Si le développement d'algorithmes "maison" pour l'analyse semi-automatique voire automatique des signaux est en train de se développer actuellement, ils n'étaient pas disponibles pour les études composant cette thèse et toutes les analyses ont été faites manuellement. Actuellement, d'autres systèmes implantables plus récents mesurent à peu près les mêmes paramètres combinés aussi à la mesure de la pression artérielle par télémetrie sur des animaux plus petits comme des souris, des rats ou autres rongeurs (Kramer et al. 2001 ; Kramet et Kinter, 2003). L'expertise de la télémetrie s'est même étendue à l'étude de certains poissons (Snelderwaard et al. 2006). Cependant, le système de notre laboratoire est dans la littérature celui qui est capable d'étudier simultanément le plus grand nombre de signaux physiologiques en même temps (Samson et al. 2011).

## 2) Projet hypoxie/hypercapnie :

L'étude de différents stress néonataux sur des fonctions physiologiques telles que la déglutition, la respiration et la variabilité du rythme cardiaque ont nécessité la mise en place de techniques expérimentales jusqu'alors jamais utilisées au laboratoire. La revue de la littérature sur l'exposition des ovins à l'hypoxie et/ou l'hypercapnie révèle des techniques incluant l'utilisation d'un cathéter trachéal chez la brebis (Pulgar et al. 2007 ; Pulgar et al. 2009 ; Kim et al. 2005) ou la compression de l'artère pulmonaire grâce à un ballon vasculaire (Dalinghaus et al. 1995). Plus simplement, certains groupes ont déplacé les brebis en altitude (Buchholz et Duckles 2001 ; Herrera et al. 2007). Cependant ces techniques sont soit inaccessibles (hébergement et expérimentation en haute altitude), soit contraignantes pour les animaux qui doivent alors être anesthésiés ou contentionnés. Ainsi, en plus de la radiotélémetrie discutée plus haut, notre technique d'exposition des ovins sans sédation ni contention à des mélanges gazeux hypoxique et hypercapnique s'inspire directement de nombreuses études antérieures faites notamment chez le rat, le cochonnet, l'humain et même la brebis. Cette technique utilisée par certains groupes de recherche consiste dans la ventilation d'un espace clos et étanche avec un mélange gazeux prédéterminé semblable à ce que l'on peut voir en technique de pléthysmographie (Pequignot et Hellstrom, 1983 ; Coates et al. 1984 ; Mortola et al. 1986 ; Hislop et al. 1997 ; Wang et al. 2007). Cependant, soumettre des ovins à un mélange gazeux prédéterminé a nécessité quelques adaptations. Deux problèmes se sont alors présentés à nous :

- Le premier problème résidait dans la taille des agneaux nouveau-nés et des normes de surface au sol imposées par le CCPA à savoir environ 0,6 m<sup>2</sup> par animal. Pour pallier à ce problème, la construction d'un caisson d'exposition étanche en plexiglas a été nécessaire grâce à la collaboration étroite de la faculté de génie de l'université de Sherbrooke à ce projet (Pr Philippe Micheau). Ce caisson d'une taille d'environ 1 m<sup>3</sup> (1x1x1m) comprend plusieurs caractéristiques indispensables à ce projet :

1. Une porte latérale pour entrer et sortir l'agneau et permettre un entretien facile de la chambre d'exposition.

2. Des entrées de gaz adaptables pour la majorité des tubulures médicales à gaz et une sortie de gaz (ouverture fonctionnant sur le principe de pression positive induite par l'entrée de mélange gazeux) situées dans la partie supérieure du caisson. La ventilation du caisson a en tout temps respecté les normes du CCPA. Il en a été de même pour les valeurs de température et d'humidité.

3. Deux orifices de 20 cm de diamètre sur les parois latérales sur lesquels sont adaptés des gants en caoutchouc pour manipuler les animaux et/ou prélever des échantillons sanguins ou autres pendant l'exposition sans modifier la composition du mélange gazeux à l'intérieur du caisson.

4. Un sol en acier inoxydable avec un drain de grande taille pour faciliter le lavage à grande eau et permettre la désinfection.

- Le deuxième problème résidait dans la formulation de mélanges gazeux stables pour une exposition aiguë des animaux sur une période de 4 à 6 heures. L'option de mélanger l'air médical (21% O<sub>2</sub>) avec de l'azote pour obtenir un mélange hypoxique (10%) isocapnique et d'ajouter à l'air médical du CO<sub>2</sub> pour un mélange hypercapnique (5%) normoxique a été choisie. Le maintien de telles concentrations est possible par l'analyse en temps réel des gaz présents dans le caisson par un analyseur de concentration d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> (Capnomac II, Datex-Ohmeda, Mississauga, ON, Canada). L'échantillonnage des gaz se fait bien sûr à hauteur du museau de l'agneau soit environ 30 à 40 cm du sol.

### 3) **Projet exposition à la fumée de cigarette :**

Une tâche importante de la mise en place de ce projet de doctorat résidait dans la construction et la validation d'un système d'exposition à la FEC capable de reproduire autant que possible la fumée environnementale de cigarette à laquelle un nouveau-né humain pourrait être soumis. Le défi de mettre au point une "**machine à fumer automatique (ASM)**" a été relevé avec succès grâce à notre collaboration avec l'équipe du Pr Philippe Micheau de la faculté de génie mécanique de l'université de Sherbrooke.

L'ASM se place parmi les machines les plus simples d'utilisation et les plus complètes dans le domaine de la recherche en général et plus particulièrement dans le domaine de la recherche animale (Duvareille et al. 2010). Ainsi, elle fait directement concurrence aux machines de l'industrie du tabac certes très performantes mais difficiles d'utilisation et ne favorisant qu'une partie de la fumée secondaire correspondant à de la fumée dite "sidestream" âgée et diluée. En effet, la fumée environnementale se compose de plusieurs types de fumées dites secondaires :

1. La fumée dite "sidestream" est issue de la combustion spontanée de la cigarette dans le cendrier à basse température. Ce type de fumée se subdivise en deux catégories dépendamment du moment où elle est inhalée. Si elle est inhalée directement à la sortie de la cigarette, on parlera de fumée dite fraîche. Si l'on attend qu'elle retombe et se dilue dans l'air elle sera dite âgée/diluée.

2. La fumée dite "mainstream", correspond à la fumée inhalée par le fumeur produite à plus haute température influençant par le fait même la composition chimique de cette dernière. Dans le même ordre d'idée que ci-dessus, il existe donc une fumée "mainstream" dite fraîche et une autre dite âgée /diluée.

3. La fumée dite "mainstream" exhalée par le fumeur qui peut être aussi fraîche et âgée/diluée.

4. De plus, depuis quelques temps, certains groupes d'études semblent tabler sur l'existence d'une fumée dite tertiaire (Matt et al. 2004 ; Winickoff et al. 2009). La fumée tertiaire est un nouveau concept. Elle est composée des mêmes substances toxiques contenues dans la fumée et qui subsistent après que le fumeur a éteint sa cigarette. Il s'agit de la fumée qui reste piégée dans les cheveux, la peau, les murs, les tissus, les tapis, les meubles et les jouets. Elle s'accumule avec le temps. Les substances nocives contenues dans la fumée qui se dépose finissent par polluer l'air et se retrouver dans les poumons. Elle est particulièrement à risque pour les bébés et les enfants qui jouent à terre sur le tapis et portent les objets à leur bouche.

Dans le cadre de ces expérimentations, chaque agneau inhale un mélange "sidestream" et "mainstream" produite par l'ASM. De plus, étant exposés deux par deux, chaque agneau est en contact avec de la fumée "mainstream" exhalée produite par l'autre agneau présent. A ceci s'ajoute les fumées de tout type âgées/diluées et de la fumée tertiaire emprisonnée dans la laine des animaux. Ainsi, notre système d'exposition reproduit de la fumée dite secondaire dans son entier comme rencontrée durant l'exposition des nourrissons humains à domicile.

De plus, l'ASM possède une interface simple d'utilisation permettant de moduler le degré d'exposition en terme de fréquence de cigarettes brûlées (temps entre deux cigarettes de 1 à 60 min), de fréquence de bouffées (temps entre deux bouffées de 1 à 60 sec) et de volume de bouffée (1 à 60 ml). Le seul paramètre stable de cette machine reste la durée d'une bouffée paramétrée à 2 secondes (normes ISO 3308). Le degré d'exposition individuel peut facilement être analysé par un simple prélèvement d'urine permettant la mesure d'un rapport cotinine/créatinine comparable à des valeurs de références souhaitées retrouvées en clinique dans la littérature (Blackburn et al. 2005 ; Joseph et al. 2007 ; Anuntaseree et al. 2008 ; Kott et al. 2008).



### **Chapitre 3 : Effets de l'hypoxie/hypercapnie et de la fumée environnementale de cigarette sur la fréquence des déglutitions.**

Les nouveau-nés humains peuvent être soumis à des stress respiratoires comme l'hypoxie et/ou l'hypercapnie durant des situations fréquentes comme le coucher sur le ventre durant la nuit ou l'obstruction du nez et de la bouche par une couverture. Certaines maladies respiratoires rencontrées en unités de soins intensifs néonataux, comme la dysplasie bronchopulmonaire des prématurés, le syndrome de détresse respiratoire... s'accompagnent aussi d'hypoxie et/ou d'hypercapnie. De plus, le visage actuel de nos sociétés modernes s'est grandement enfumé au cours des 50 dernières années non seulement à cause de la pollution atmosphérique mais aussi et surtout à cause du nombre croissant de fumeurs. Ainsi, le taux de cancers du poumon est à son plus haut niveau (troisième cancer le plus prévalent chez l'homme et la femme) et reste le plus meurtrier en 2010, tant chez l'homme que chez la femme. Un autre fait important reste que, parmi les fumeurs, la proportion de femmes est en constante augmentation. Les lois antitabac n'ont pas modifié l'exposition à la FEC à la maison, qui représente l'exposition la plus importante pour un nourrisson. Certaines mères n'hésitent pas à fumer pendant qu'elles allaitent ou bercent leur enfant. Ainsi, depuis la campagne « Dodo sur le dos » des années 90, la FEC est généralement considérée comme le principal facteur de risque évitable du SMSN avec une augmentation du risque de décès avant l'âge de un an multiplié par 2 à 5 (Anderson et Cook, 1997 ; Hafström et al. 2005).

#### **I. Effets de l'hypercapnie :**

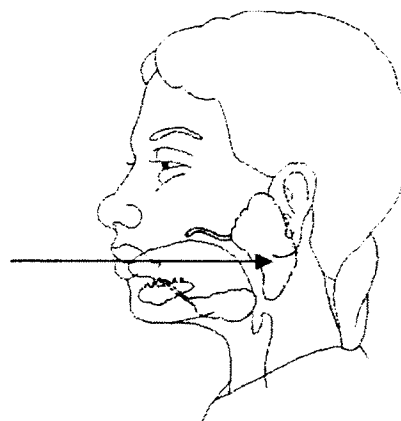
Les résultats de cette thèse démontrent clairement que l'hypercapnie stimule la fréquence des DNN quel que soit le stade de conscience. Ces résultats sont en opposition avec ceux chez l'humain adulte où une diminution est observée (Nishino et al. 1998) et ceux chez le chat où aucun effet n'est observé (Nishino et al. 1986). A ce stade, plusieurs explications peuvent être proposées (figure 14).

**Hypothèse 1: salive/digestif**

Production de salive inchangée

↓ Ions  $Cl^-$  salive

↑ RGO

**Hypothèse 2: larynx / pharynx**

↑ Fibres type 1

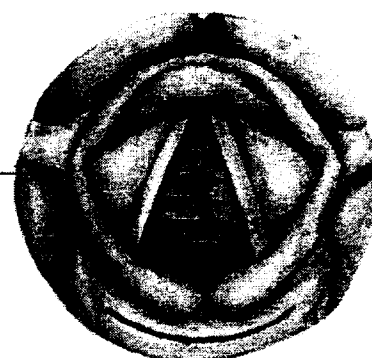
↓ Fibres à adaptation lente

↑ NLS

↑ Irritation laryngée

↑ Muscle genioglosse

↑ Nerf grand hypoglosse

**Hypothèse 3: centres/respiration**

Centres resp. et dég. fusionnés

Hyperventilation

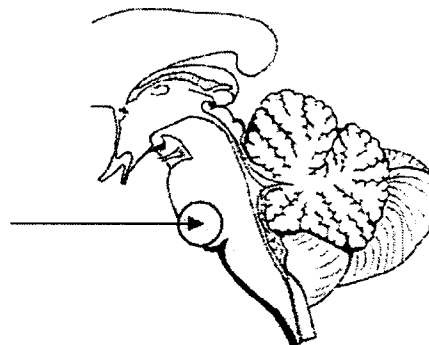


Figure 14 : Schéma récapitulatif des effets de l'hypercapnie au niveau salivaire, de la région du larynx / pharynx, de la respiration et des centres de la déglutition et de la respiration. Ions  $Cl^-$  : Ions chlorure ; RGO : Reflux Gastro-Œsophagiens ; NLS : Nerf Laryngé Supérieur ; Centres resp. et deg. fusionnés : Centres de la respiration et de la déglutition fusionnés.

1. La première est d'origine mécanique et correspond à une augmentation potentielle de la production de salive. Nous n'avons pas observé d'augmentation de la production de salive en hypercapnie chez l'agneau. Cette observation est en accord avec les résultats chez l'homme exposé à un mélange riche en CO<sub>2</sub> durant la plongée où la stabilité du débit salivaire est assurée par une baisse de la concentration en ions chlorures (Schaeffer, 1979). Cependant, cet article rapporte une augmentation de l'acidité gastrique et des symptômes de reflux gastro-œsophagiens, qui pourraient être responsables d'une augmentation des DNN.

2. La deuxième est d'origine laryngée et repose sur l'hypothèse de la stimulation des récepteurs de la muqueuse directement par le CO<sub>2</sub>. En effet, de nombreuses recherches ont montré que les récepteurs de la muqueuse laryngée sont sensibles à différents stimuli *via* des études sur le NLS. Boushey et al. en 1974 ont démontré que le CO<sub>2</sub> active les fibres de type 1 (myélinisées sans activité spontanée) et inhibent les fibres de type 2 (myélinisées à adaptation lente et activité basale importante) chez des chats anesthésiés. Cette modulation a aussi été observée sur le larynx isolé chez le chat anesthésié et décérébré (Bartlett et Knuth, 1992) et chez le chien anesthésié (Anderson et al. 1990) probablement via la stimulation du NLS directement par le CO<sub>2</sub> (Bradford et al. 1990 ; Bradford et al. 1993). En général et sur une échelle plus macroscopique, il a été démontré que l'hypercapnie augmente l'irritation laryngée (Nishino et al. 1998). Les études ci-dessus sur larynx isolé ont utilisé un taux stable de CO<sub>2</sub> pour ventiler la muqueuse. D'autres études sont arrivées aux mêmes résultats avec des niveaux de CO<sub>2</sub> variables pour mimer l'inspiration et l'expiration (Bartlett et al. 1992 ; Bradford et al. 1998). Ainsi, le CO<sub>2</sub>, en modulant l'activité de nombreux récepteurs laryngés / pharyngés et en entraînant une stimulation du NLS qui peut à elle seule déclencher une déglutition (Doty, 1968 ; Dubner et al. 1978), pourrait par cette boucle contrôle induire une augmentation de la fréquence des DNN au repos.

De plus, au niveau musculaire, le CO<sub>2</sub> a une action sur les muscles des VAS en stimulant l'activité du muscle génioglosse (Nolan et al. 1990) et du nerf grand hypoglosse (Bartlett et Knuth, 1992).

3. La troisième hypothèse repose sur la configuration bulbaire des centres de la déglutition et de la respiration, comme expliqué dans l'introduction. Premièrement, il est à noter qu'une partie importante de la chémoréception du CO<sub>2</sub> *via* une baisse ou non du pH du liquide céphalo-rachidien (LCR) est d'origine centrale, contrairement à la chémoréception de l'O<sub>2</sub> à prédominance périphérique. En effet, de nombreuses études ont impliqué de nombreux regroupements neuronaux tant cérébraux que bulbaires dans la chémodétection du CO<sub>2</sub> au niveau central. Ainsi, les noyaux du raphé (Nattie et Li, 2001 ; Taylor et al. 2005 ; Nattie et Li, 2008 ; Dias et al. 2008), le noyau rétrotrapezoïde (Li et Nattie, 2002), le NTS (Nattie et Li, 2002) et la surface ventrolatérale du bulbe (Neubauer et Sunderram, 2004) sont impliqués. Leur activation par l'augmentation du CO<sub>2</sub> ou la diminution du pH local induit une stimulation de la respiration, comme observé dans cette étude et celles citées précédemment. Deuxièmement, si les centres respiratoires et de la déglutition semblent être interconnectés chez l'animal adulte (Jean, 2001), ils seraient même incomplètement séparés en période néonatale, tout du moins chez le chaton (Sumi, 1967 ; Sumi, 1975). Ainsi, durant le stress hypercapnique, la stimulation des centres de la respiration qui sont étroitement interconnectés, voir fusionnés avec les centres de la déglutition, peut causer une stimulation secondaire de la déglutition.

En résumé des effets de l'hypercapnie sur la fréquence des DNN, l'implication de 3 mécanismes reste plausible pour expliquer l'augmentation des DNN: 1. La modification de la sécrétion salivaire (volume et/ou composition), 2. La stimulation des récepteurs de la muqueuse laryngée, 3. La stimulation conjointe des centres de la respiration et de la déglutition. Ainsi, tel que proposé antérieurement, l'augmentation des DNN en hypercapnie pourrait être un mécanisme de défense des VAI au même titre que l'augmentation de la toux observée chez l'être humain adulte (Nishino et al. 1998).

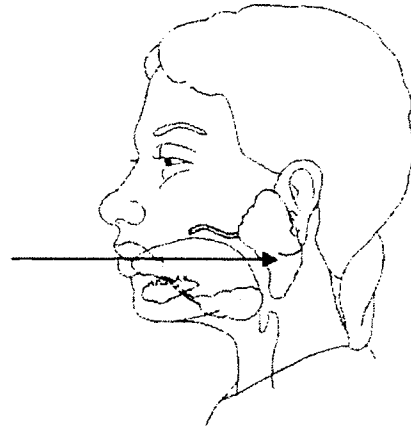
## **II. Effets de l'hypoxie :**

L'hypothèse d'un effet potentiel de l'hypoxie (ou de l'hypercapnie) sur les déglutitions reposait sur l'existence d'une pause respiratoire durant la déglutition et sur un contrôle central commun de la déglutition et de la respiration au niveau du NTS dans le tronc cérébral. Des observations au niveau moléculaire dans le NTS viennent renforcer l'hypothèse d'une interaction entre les deux fonctions physiologiques, spécialement en hypoxie. Il a en effet été observé que le glutamate, en s'intégrant dans une boucle dite NMDA / NO, permet l'amplification du stimulus hypoxique au niveau du NTS et active la réponse cardio-respiratoire à l'hypoxie (Haxhiu et al. 1995). Ce même neurotransmetteur a aussi été impliqué dans la fonction de déglutition grâce à une expérimentation judicieuse de microinjections de glutamate dans le NTS pour reproduire des déglutitions similaires à celle observées lors de la stimulation du NLS (Kessler et al. 1990). De plus, les récepteurs NMDA et non-NMDA au glutamate ont aussi été impliqués (Kessler et Jean 1991).

Ainsi, les résultats ci-dessus suggèrent que l'hypoxie pourrait augmenter les DNN. Cependant, une diminution des déglutitions a été observée chez le chat anesthésié en hypoxie (Nishino et al. 1986). Finalement, nos résultats chez les agneaux ne rapportent aucun changement de la fréquence des DNN durant un stress hypoxique à 10%. Afin d'expliquer nos résultats, un raisonnement basé sur trois hypothèses peut être fait, comme pour l'hypercapnie (figure 15).

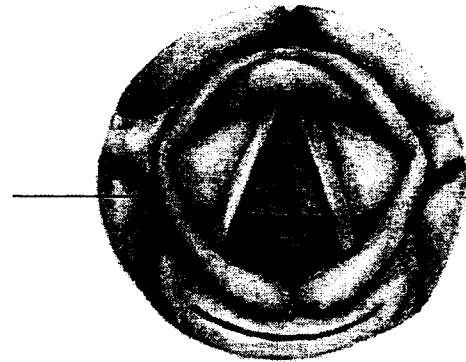
### Hypothèse 1: salive

↓ ou ↑ Production de salive  
↓ Ions  $K^+$  salive



### Hypothèse 2: larynx/poumons

↓ Nerf hypoglosse  
↑ R. adaptation lente BP  
↑ Muscles cricoaryténoïdiens



### Hypothèse 3: centres/respiration

Centres resp. et dég. Fusionnés  
Glutamate neuroT commun  
Hyperventilation  
(hypocapnie relative)

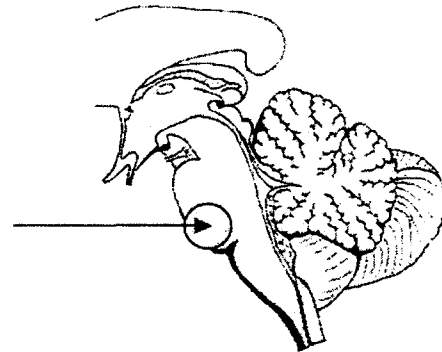


Figure 15 : Schéma récapitulatif des effets de l'hypoxie au niveau salivaire, de la région du larynx, de la respiration et des centres de la déglutition et de la respiration. Ions  $K^+$  : Ions potassium ; R. adaptation lente BP : Récepteurs broncho-pulmonaires à adaptation lente; Centres resp. et deg. fusionnés : Centres de le respiration et de la déglutitions fusionnés ; Glutamate neuroT commun : Glutamate neurotransmetteur commun au contrôle de la déglutition et de la respiration en hypoxie.

1. La première nécessite donc un débit salivaire stable (valeur identique à la normoxie), comme observé dans cette étude. Cependant, comme pour l'hypercapnie, quelques études ont évalué l'effet de l'hypoxie sur différents modèles. Selon certains, l'hypoxie chronique diminue le débit salivaire lorsque ce dernier est stimulé pharmacologiquement par des agonistes muscariniques comme la méthacholine chez le rat (Bianciotti et al. 1994). D'autres prétendent que le débit salivaire est augmenté en hypoxie chez l'homme en association avec une diminution de la concentration en potassium (Pilardeau et al. 1990). Comme pour l'hypercapnie, il est possible qu'il existe un effet de la composition salivaire sur la fréquence des DNN *via* la stimulation de différents récepteurs pharyngo-laryngés.

2. La deuxième hypothèse basée sur les effets potentiels de l'hypoxie sur les récepteurs de la région pharyngo-laryngée est moins bien documentée que pour l'hypercapnie. Cependant, il semble que l'hypoxie joue un rôle important dans cette région responsable de l'activité motrice de la déglutition. En effet, l'hypoxie semble être capable d'inhiber la stimulation des nerfs hypoglosse par l'hypercapnie (Bartlett et Knuth, 1994). De plus, l'hypoxie semble activer les récepteurs bronchopulmonaires à adaptation lente chez les chiots et les chiens adultes (Fisher et al. 1983). Chez le lapin, la stimulation de ces mêmes récepteurs bronchopulmonaires par l'hypoxie stimulerait l'activité des muscles cricoaryténoïdiens postérieurs (Bartlett et al. 1981) impliqués dans la déglutition. Ainsi, l'hypoxie aurait du augmenter la fréquence des DNN elle aussi *via* la tachypnée qu'elle induit (tachypnée importante observée dans cette étude). Cependant, l'hyperventilation *per se* ne semble pas stimuler la déglutition en hypoxie. Existe-t-il un effet inhibiteur central direct de l'hypoxie sur les centres de la déglutition? Ou est-ce l'absence de CO<sub>2</sub>, voir une hypocapnie relative centrale ou laryngo-pharyngée en hypoxie, qui ne permet pas cette activation? De plus, il est à noter que lors d'un stress hypoxique aigu, l'augmentation du réflexe de toux offre un bon système de défense des VAI. Mais, à l'inverse, d'autres études en hypoxie prolongée démontrent au contraire que le réflexe de toux est diminué (Hanacek et al. 2006 ; Eckert et al. 2006 ; Widdicombe et Singh, 2006).

3. La troisième hypothèse remet en question la chémosensibilité centrale à l'O<sub>2</sub>. En effet, à la différence de l'hypercapnie, la détection de l'hypoxémie est surtout un processus périphérique au niveau des chémorécepteurs carotidiens. Les centres comme le raphé bulbaire détectent bien le CO<sub>2</sub>, comme expliqué précédemment, mais ne détectent pas l'hypoxémie (Taylor et al 2005). Des preuves de la chémosensibilité centrale de l'O<sub>2</sub> ont été démontrées au niveau de l'hypothalamus caudal en association avec la stimulation de la respiration (Horn et Waldrop, 1997). Se basant sur le fait que chez le nouveau-né, les centres de contrôle de la respiration et de la déglutition ne semblent pas encore être bien séparés, pourquoi l'hypoxie n'augmente-t-elle pas la fréquence des DNN ? Un élément de réponse vient peut-être du fait que la détection de l'hypoxémie au niveau de la portion ventrolatérale du bulbe rostral (Kawai et al. 1999) stimule les neurones vasomoteurs, mais inhibe les neurones respiratoires (Sun et al. 1994).

En résumé de ce paragraphe traitant des effets de l'hypoxie sur la fréquence des DNN, les données de la littérature sur le débit salivaire, la détection de l'hypoxie par les récepteurs laryngés/bronchopulmonaires et les centres de contrôle de la respiration et de la déglutition restent très contradictoires. Globalement, l'hypoxie ne serait pas un stimulus suffisant pour faire des DNN un mécanisme de défense contre les aspirations. L'absence d'effet de l'hypoxie sur la fréquence des DNN dans cette étude semble dépendre du résultat de l'interaction centrale de nombreux neurones sensibles à l'oxygène capables de moduler positivement ou négativement l'activité des neurones respiratoires du NTS et fort probablement des neurones impliqués dans la déglutition. Ainsi, malgré l'hyperventilation en hypoxémie statistiquement plus forte que celle observée en hypercapnie, la fonction de déglutition demeure non perturbée.

En conclusion, les résultats apportés en hypoxie et en hypercapnie sur la fréquence des DNN ne peuvent être expliqués par une simple boucle neuronale mais dépendent de l'interaction d'influx multiples tant au niveau périphérique que central dont la composante reste une modification de l'activité neuronale au niveau des centres de la déglutition responsables de la fréquence des DNN. De plus, l'absence d'effet de l'hypoxémie sur les DNN malgré une hyperventilation marquée, laisse supposer un certain rôle du CO<sub>2</sub>. Ainsi, en hypercapnie, la fréquence des DNN est augmentée alors qu'en hypoxémie, la fréquence



des DNN demeure inchangée. L'hypocapnie relative induite par l'hyperventilation pourrait expliquer ce fait, au moins en partie.

### **III. Effets de la fumée environnementale de cigarette :**

Les effets de la FEC sur la fréquence des déglutitions sont très peu documentés dans la littérature. En effet, seulement deux études du même groupe de recherche se sont attardées sur les effets de la fumée secondaire sur la déglutition. Ces deux études faites chez le fumeur adulte actif révèlent que bien que la fréquence des déglutitions ne soit pas perturbée, un plus grand volume d'eau est nécessaire pour déclencher une déglutition (Dua et al 1998, Dua et al. 2002). Cependant immédiatement après la consommation de deux cigarettes la fréquence des DNN est augmentée chez les fumeurs chroniques (Dua et al. 1998). Notre hypothèse de départ voulait que l'inflammation laryngée provoquée par la FEC perturbe la déglutition. Les preuves d'une inflammation de la muqueuse laryngée secondaire à la FEC et au tabagisme actif ont été faites chez le cochon, l'humain et sur l'épithélium cilié à la base de l'épiglotte chez le rat (Ben Gamra et al. 2007; Mouadeb et al. 2009; Lewis, 1981). Cependant notre étude ne démontre aucune inflammation laryngée secondaire à une exposition de 15 jours à la FEC (20 cigarettes par jour). De plus, aucun changement dans la fréquence des déglutitions n'est observé au même titre qu'une autre étude menée dans notre laboratoire chez des agneaux nouveau-nés à terme avec une inflammation laryngée induite par une laryngite de reflux (Brisebois et al. 2010 données non publiées). Bien que l'induction d'une inflammation laryngée légère à modérée en période postnatale ne perturbe pas la fréquence de base des DNN, une étude de notre groupe sur le même modèle de FEC montre que les DNN n'augmentent pas autant que chez les agneaux contrôles lors des chémoréflexes laryngés induits, attestant d'une certaine atteinte de la fonction de déglutition dans notre modèle (St-Hilaire et al. 2010). Dans le même ordre d'idée, une diminution de la fréquence des déglutitions nutritives est observée chez les agneaux avec une laryngite de reflux lors de l'allaitement sans toutefois perturber la coordination DN-respiration (résultats non publiés).

D'autres études se sont attardées aux effets de la FEC et/ou de la nicotine sur différentes parties du tractus digestif plus ou moins en relation directe avec la déglutition (allant des muscles mylohyoïdes jusqu'au duodénum). Le paragraphe suivant fera la revue de littérature sur les effets de la FEC sur le tractus digestif (figure 16) et proposera des hypothèses quant aux répercussions de ces effets sur la déglutition.

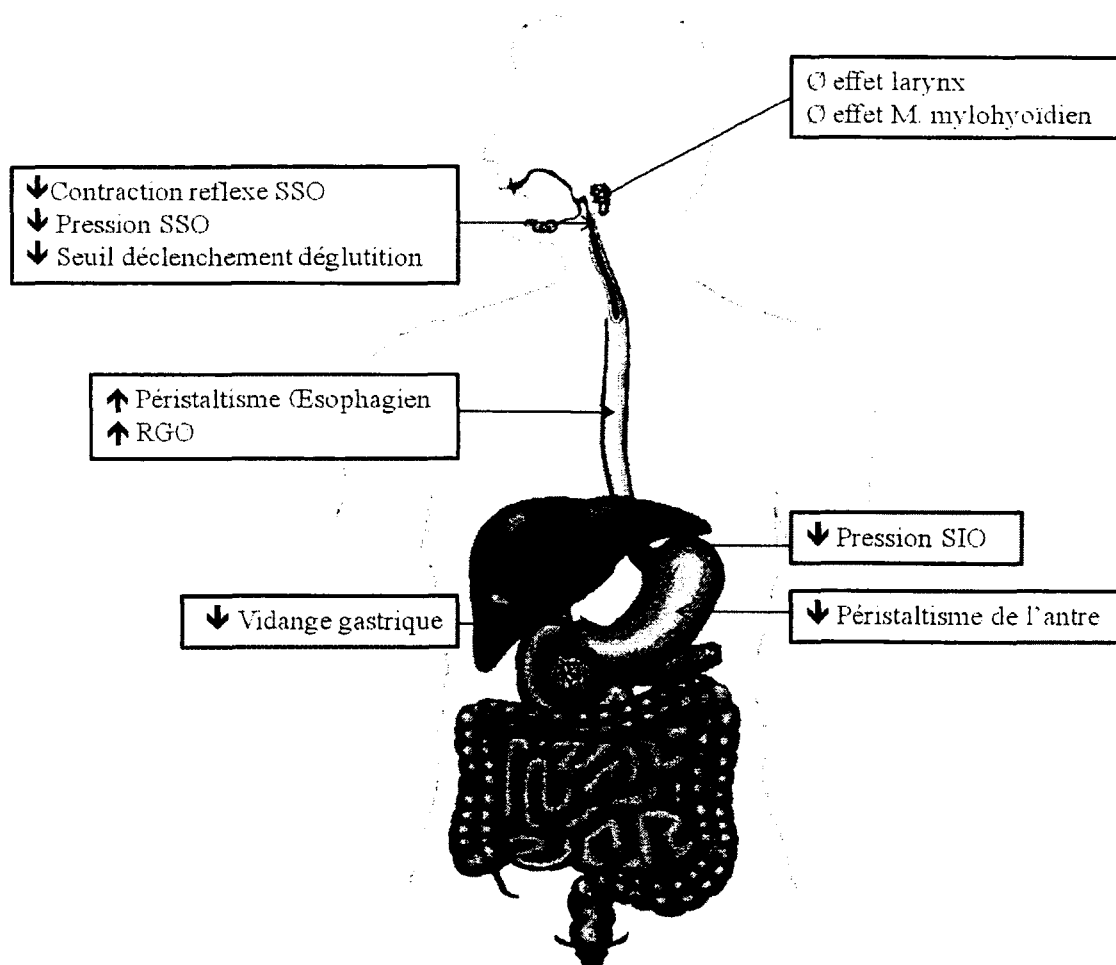


Figure 16 : Schéma récapitulatif des effets de la fumée de cigarette ou de la nicotine sur le tractus digestif. SSO : sphincter supérieur de l'œsophage; SIO : sphincter inférieur de l'œsophage; RGO : reflux gastro-œsophagien; Ø : aucun.

Physiologiquement, la présence de liquide dans le pharynx induit plusieurs réflexes au niveau du larynx et du SSO. Le réflexe pharyngo-glottique correspond à une adduction réflexe des cordes vocales pour éviter les aspirations. Cependant, chez les fumeurs chroniques, des expériences par vidéo-endoscopie ont démontré une diminution de ce réflexe se traduisant par la nécessité d'un plus grand volume d'eau dans le pharynx pour déclencher ce réflexe (Dua et al. 2002); le réflexe est même aboli dans 60% des cas si l'injection d'eau se fait lentement. De plus, aucun effet n'est observé sur les muscles mylohyoïdiens et pharyngés chez le chat après une injection de nicotine intra-veineuse (Greenwood et al. 1992). Une contraction réflexe du SSO est aussi normalement observée lors de la présence d'eau directement instillée dans le pharynx; elle a été interprétée comme protectrice en limitant les reflux pharyngés. De plus, lorsque le volume d'eau détecté au niveau des sinus pyriformes dépasse un certain seuil, une déglutition réflexe est déclenchée comme expliqué en introduction. Les effets du tabac sur le SSO ont été étudiés par des expériences judicieuses combinant injection d'eau dans le pharynx et la mesure de la pression au niveau du SSO via un cathéter. Les résultats des effets du tabac sur le SSO vont toutes dans le sens d'une perte de l'efficacité de ce dernier chez les fumeurs chroniques. En effet, il a clairement été démontré que chez les fumeurs, un volume d'eau plus important est nécessaire pour déclencher la contraction réflexe protectrice du SSO contre les reflux et déclencher une déglutition (Dua et al. 1998). Aucun effet sur la fréquence des déglutitions chez les fumeurs chroniques n'a été mis en évidence. Les effets du tabac sur le SSO semblent être directement liés à un effet local plutôt qu'à un effet central de la nicotine (Dua et al. 2009). De façon plus générale, certains affirment que le SSO est à l'état basal plus relâché chez les fumeurs chroniques (Greenwood et al. 1992).

Au niveau du transit œsophagien, aucun effet n'a été rapporté chez le fumeur chronique ou chez les consommateurs de nicotine en gomme à mâcher (Miller et al. 1989). Cependant, chez le chat anesthésié à la kétamine, l'injection intraveineuse aiguë de nicotine stimule le péristaltisme œsophagien (Greenwood et al. 1992) impliquant la neurotransmission ganglionnaire nicotinique et la libération d'acétylcholine sur les récepteurs muscariniques des cellules musculaires lisses (Blank et al. 1989). Les observations faites au niveau du SSO sont aussi juxtaposables au niveau du SIO dont la pression est nettement diminuée chez les fumeurs chroniques (Chattopadhyay et al. 1977 ; Stanciu et Bennett, 1972 ;

Kahrilas et Gupta, 1990). Dans l'estomac, la consommation de tabac a des répercussions au niveau de la vidange gastrique. Bien que certains groupes prétendent que cette dernière est augmentée (Grimes et Goddard, 1978) ou non modifiée chez les fumeurs chroniques (Petring et al. 1985), la majorité des études s'entendent sur une diminution de la vidange gastrique chez l'homme (Nowak et al. 1987 ; Miller et al. 1989 ; Johnson et al. 1991) qui serait directement liée à la nicotine. Une expérience judicieuse d'enrichissement des cigarettes en nicotine a démontré un effet direct inhibiteur nicotinique sur la vidange gastrique (Gritz et al. 1988) dont l'hypothèse principale serait l'inhibition directe de l'activité motrice de l'antrum de l'estomac comme démontrée chez le chien anesthésié ou non en aigu (Carlson et al. 1970). Plus précisément, au niveau de l'antrum, l'effet inhibiteur de la nicotine serait le résultat de la libération de catécholamines par une stimulation directe des glandes surrénales. Les catécholamines agiraient via le système nerveux et non directement sur les cellules musculaires lisses gastriques (Carlson et al. 1970). L'implication de la nicotine est toutefois mise en doute par d'autres études ayant utilisé de la nicotine sous forme de gomme à mâcher et non en injection intraveineuse (Miller et al. 1989 ; Chaudhuri et Fink, 1988). Bien que de nombreuses études concernant les effets de la FEC et/ou de la consommation de cigarettes sur la partie intestinale de l'appareil digestif ainsi que sur le foie et le pancréas aient été menées, elles ne seront pas présentées car jugées moins pertinentes pour la discussion de cette thèse.

En résumé, sur le plan clinique, la consommation chronique de cigarettes serait directement impliquée dans l'initiation, l'aggravation et l'entretien des RGO et des ulcères gastroduodénaux. La perturbation de la vidange gastrique et une faiblesse des sphincters œsophagiens combinée à l'hypersécrétion d'acide, de pepsinogène, de bile, de réactifs oxygénés et de vasopressine et à une diminution de la sécrétion de mucus en seraient à l'origine (Maity et al. 2003). Si l'on ajoute à ce tableau l'augmentation de la pression intra-abdominale comme durant la toux ou l'inspiration forcée, nous comprenons que les fumeurs chroniques soient plus à risque de RGO (Kahrilas et Gupta, 1990 ; Pandolfino et Kahrilas, 2000). Le tabagisme passif et actif est aussi impliqué chez 30% des enfants ou adolescents souffrant de RGO, de douleur gastrique chronique et d'œsophagite

(Wielkoszynski et al. 2006). Ainsi, dans le cadre de notre étude, une augmentation des déglutitions aurait pu être observée en réponse à d'éventuels RGO. L'absence de perturbation de la fréquence des déglutitions après une exposition à la FEC de 15 jours soulève la question d'une exposition insuffisamment prolongée pour induire des RGO significatifs capables de stimuler la muqueuse laryngée (aucune inflammation observée sur les coupes de larynx) et de stimuler la déglutition. Les agneaux sont-ils moins sensibles aux particules retrouvées dans la fumée de cigarette? Il est aussi à noter que la FEC induit une baisse de la production salivaire (Guslandi, 2000), observation qui va dans le sens d'une diminution de la fréquence des déglutitions. Ainsi, il est possible que la FEC entraîne différents effets concomitants mais opposés, l'effet global sur la fréquence des DNN étant finalement nul.

## **Chapitre 4 : La coordination DNN-respiration est une fonction physiologique très robuste.**

Comme démontré dans les études composant cette thèse, un stress respiratoire hypercapnique est capable de perturber la coordination DNN-respiration chez l'agneau nouveau-né à terme démontrant une dominance des DNN de type ie, alors qu'un stress respiratoire hypoxique, ne perturbe pas la coordination. De plus il est à noter que la FEC semblerait dans une moindre mesure diminuer les DNN de type ii en SC.

### **I. Données obtenues chez l'agneau :**

Quel que soit le stress auquel sont exposés les agneaux, la coordination demeure semblable à celle démontrée pour la première fois par Reix et al. 2003. Les DNN de type inspiratoire prédominant (type i supérieur au type ie), alors que les types expiratoires sont minoritaires (types ei supérieur au type e le plus souvent). D'autres études menées au sein de notre laboratoire démontrent aussi qu'il est très difficile, voir impossible de perturber cette coordination DNN-respiration qui semble être une fonction physiologique très robuste. Une des premières études sur la coordination démontre que la prématurité n'a aucun effet (Reix et al. 2004). Les mêmes conclusions sont avancées pour l'application d'une CPAP nasale de 6 cm H<sub>2</sub>O chez des agneaux nés à terme et en bonne santé (Samson et al. 2005) et chez des agneaux soit bivagotomisés, trachéomisés ou avec les VAS isolées (Samson et al. 2008). Des études de notre laboratoire présentées à l'American Thoracic Society à la Nouvelle-Orléans en 2010 tendent vers la même observation chez des agneaux avec une inflammation des VAS secondaire à une laryngite de reflux (Brisebois et al. 2010).

De plus, il a aussi été observé que cette fonction est certes robuste chez les nouveau-nés ovins, mais que la maturation des agneaux eux-mêmes vers l'âge adulte et l'acquisition de la capacité à ruminer ne modifient en rien la coordination DNN-respiration (Roberge et al. 2007). La prédominance du type i a aussi été démontrée chez un autre ruminant, la chèvre adulte (Feroah et al. 2000) et chez le lapin adulte (Mc Farland et Lund, 1993).

## II. Données obtenues chez l'humain :

Chez l'être humain, la coordination déglutition-respiration a aussi fait l'objet de nombreuses recherches notamment chez l'adulte. Mais la coordination démontrée dans tous les modèles expérimentaux humains révèle une coordination à l'opposé de celle retrouvée chez le mouton, la chèvre ou encore le lapin. En effet, chez l'homme et la femme adulte, les déglutitions surviennent le plus souvent en expiration favorisant les types ee au détriment du type ii minoritaire. L'explication est basée sur le fait qu'en expiration la protection des VAI est renforcée par une capacité accrue d'élévation du larynx (McConnel et al. 1986 ; Cook et al. 1989 ; Jacob et al. 1989 ; McConnel et al. 1988). Cette observation a été faite en faisant boire au verre de petites quantités d'eau (Preiksaitis et al. 1992 ; Shaker et al. 1992 ; Martin et al. 1994 ; Hiss et al. 2001) ou de barium (Martin-Harris et al. 2003 ; Martin-Harris et al. 2005), en déposant une petite quantité d'eau dans la cavité oropharyngée (Nishino et al. 1985), en faisant manger deux beignes en cinq à dix minutes (Smith et al. 1989) ou en donnant du jus de fruit à la cuillère à café (Selley et al. 1989). D'après ces études qui concernent la DN, la coordination déglutition-respiration demeure aussi très robuste chez l'adulte humain quelle que soit la technique expérimentale utilisée. La même observation a été faite pour la DN chez des enfants allaités âgés de 48 heures à un an (Kelly et al. 2007). Il en va de même pour les DNN chez l'adulte humain (Kelly et al. 2007). Cependant, chez le nouveau-né, il semble exister une maturation de la coordination des déglutitions avec la respiration (Kelly et al. 2007). Plus précisément, si à 48 heures de vie, les DN de type ee prédominent, elles diminuent de 33% dès la première semaine alors que les DN de type ie augmentent de 26% dès le neuvième mois de vie (Kelly et al. 2007). Ainsi, on peut observer au cours de la première année de vie une augmentation des déglutitions de type ie qui deviennent le type prédominant suivi du type ee (à la naissance, le type ee prédomine suivi du type ie). De plus, au cours de la première année de vie les déglutitions survenant durant une pause respiratoire diminuent pour devenir le type de déglutition le moins fréquent (le troisième en prévalence à la naissance). Il est à noter que la coordination DNN-respiration chez l'humain âgé de moins de un an n'est pas influencée par les stades de conscience (Kelly et al. 2008). D'autres études évaluant les effets de l'âge (Selley et al. 1989 ; Preiksaitis et al. 1992 ; Martin-Harris et al. 2005), du volume d'eau ingéré (Preiksaitis et al. 1992 ; Hiss et al. 2001) et du sexe (Hiss et al. 2001 ; Samson et al.

2010 non publié) sur la coordination entre DN ou DNN avec la respiration ont toutes montré que la coordination déglutition-respiration est très robuste.

La position du corps et donc des VAS est restée pendant longtemps la plus grande hypothèse de différence entre la coordination chez les animaux quadrupèdes (VAS horizontales) et chez les hommes bipèdes (VAS verticales). Mais sur ce point aussi, l'orientation des VAS ne change pas la coordination chez l'adulte humain de sexe masculin (Ayuse et al. 2005). Il en est de même pour la laryngectomie (Charbonneau et al. 2005). Cependant, chez la femme en position à quatre pattes, il apparaît que les DNN surviennent plus tardivement que si la femme est debout (Samson et al. 2009). Comme pour les agneaux, des études ont été menées pour les DNN chez des enfants prématurés (Nixon et al. 2008) démontrant que le type expiratoire prédomine encore, renforçant par le fait même l'hypothèse de la robustesse de la coordination déglutition-respiration malgré le changement de position avec le développement de l'être humain. Il se peut donc que l'évolution sur des siècles vers la race humaine (bipède, mais aussi le fait que le larynx soit en position beaucoup plus haute pour permettre la phonation) soit responsable de cette coordination très différente entre les humains et les autres mammifères.

Cependant, la question de l'effet du sexe sur la coordination déglutition-respiration reste controversée. En effet, sur le plan anatomique plusieurs différences ont été démontrées. L'homme est capable de déglutir de plus gros bolus comparativement à la femme (Alves et al. 2007) grâce à une géométrie du larynx légèrement différente, une plus grande ouverture et une plus grande longueur du pharynx et de la cavité buccale (Malhotra et al. 2002 ; Daniel et al. 2007 ; Alves et al. 2007). Cependant aucune des études sus-mentionnées n'a étudié la coordination déglutition-respiration. Au niveau de l'œsophage par contre, le SSO s'ouvre pour une période plus longue chez la femme (Robbins et al. 1992 ; Logemann et al. 2002) et les pauses respiratoires durant la déglutition sont plus longues (Hiss et al. 2003). Ainsi, l'hypothèse qu'il existe un effet du sexe sur la coordination déglutition-respiration est alors envisageable. Cependant, la littérature démontre qu'il n'existe pas d'effet du sexe chez l'humain adulte sur la coordination (Hiss et al. 2001). À noter que dans l'étude de Samson et al. 2009 sur l'influence de la position et du sexe entre autre, les hommes initient



leurs déglutitions plus précocement en expiration que les femmes, quelle que soit la posture.

En résumé, il apparaît donc que la coordination DNN-respiration est une fonction très robuste afin de protéger les VAI dès le plus jeune âge avec des DNN à prédominance inspiratoire chez les animaux mais à prédominance expiratoire chez les humains. Cependant quelques études très spécifiques ont démontré que l'hypercapnie chez l'agneau (Duvareille et al. 2007) ou bien la volonté chez l'humain adulte (Kelly et al. 2007) était capable de perturber cette coordination. Observation aussi faite pour la coordination DN-respiration chez l'humain qui semble très robuste excepté la première année de vie où il existe une réelle maturation (Kelly et al. 2007). De plus, il est à noter que l'étude menée par Samson et al. en 2009 démontre un effet du sexe sur le moment de survenue de la déglutition dans le cycle respiratoire (analyse quantitative), bien qu'il n'y ai pas de perturbation de la coordination qualitative plus grossière. Ainsi dans cette étude, le type ee reste le type prédominant quelque soit la condition.

### **III. Influence du type d'analyse :**

La très grande majorité des observations faites ci-dessus se basent sur une analyse descriptive de la coordination en type ii, ie, ei et ee, définie grossièrement par le moment du cycle respiratoire où commence et se termine la pause induite par la déglutition. L'analyse quantitative de Charbonneau et al. 2005 (voir introduction) propose une analyse plus fine de la coordination déglutition-respiration. Bien que le type ee prédomine toujours chez l'humain, ce type d'analyse a permis de démontrer l'existence d'un contrôle plus fin de la coordination au sein d'un type de DNN bien établi selon la classification descriptive. Ainsi, chez la femme, les DNN surviennent plus tard en inspiration pour les DNN de type ii en comparaison avec l'homme. De plus, chez les femmes, la position quadrupède retarde aussi les DNN de la phase inspiratoire en comparaison avec la position debout (Samson et al.

2009). Cependant, une autre étude montre, chez l'adulte humain de sexe masculin, un effet de la posture sur la coordination DN-respiration par un retard de la déglutition en fin d'expiration lors du passage des sujets de la position debout à la position à quatre pattes (McFarland et al. 1994). Ainsi, cette technique d'analyse plus fine permettrait de mettre en avant l'existence d'un contrôle très fin de la coordination DNN-respiration au sein d'une fonction très robuste comme l'ont démontré les analyses descriptives (le type ee prédominant chez l'humain et le type ii chez les autres espèces).

#### **IV. L'hypercapnie a un effet réel direct ou indirect via l'hyperventilation ?**

La question reste ouverte. Pourquoi si l'on fait exception de la volonté (Kelly et al. 2007) aucun stress, aucune particularité physiologique, chirurgicale ou positionnelle n'arrivent à perturber cette coordination descriptive déglutition-respiration alors que l'Hc y arrive ? La revue de littérature sur ce sujet précis ne fait ressortir qu'une seule étude qui démontre chez l'adulte humain éveillé une perturbation de la coordination déglutition-respiration sur le plan descriptif en Hc. En effet, ce type de stress augmente les déglutitions (déclenchées par un bolus d'eau) de type i et ei, alors que les types e diminuent (Nishino et al. 1998). Cependant, les résultats de cette thèse sur les effets de l'Hc sur la coordination DNN-respiration (augmentation du type ie) sont en accord partiel avec un seul autre groupe de recherche qui a étudié indirectement les effets de l'hyperventilation sur la coordination DNN-respiration démontrant une augmentation des types e et ie chez l'homme (Shaker et al. 1992). Ainsi, l'augmentation des DNN de type ie en Hc démontrée dans cette thèse serait liée non seulement à l'hyperventilation réflexe en présence de CO<sub>2</sub> mais aussi au CO<sub>2</sub> lui-même (observation non faite en Hx malgré l'hyperventilation).

## Chapitre 5 : Importance des stades de conscience

Les stades de conscience d'après Davies et al. 2004 se subdivisent chez le nouveau-né en trois catégories incluant l'éveil, le sommeil calme (SC ou nREM) et le sommeil agité (SA ou REM sleep pour Rapid Eye Movements Sleep). On peut ajouter à cette classification le sommeil indéterminé non inclus dans les analyses de cette thèse. Chaque stade de conscience est régi par des processus centraux bien distincts et des comportements physiologiques spécifiques non détaillés ici.

L'étude des effets des stades de conscience sur les DNN a été effectuée depuis la vie fœtale jusqu'à la vie adulte sur différents modèles expérimentaux. Dès la vie fœtale, il semble que la répartition des DNN soit dépendante des stades de conscience (Nijland et al. 1997). En effet, chez le fœtus d'agneau, les DNN sont plus fréquentes durant les périodes avec activité encéphalographique de haute fréquence et de faible amplitude assimilables à du sommeil REM. Le même constat est fait chez les agneaux nouveau-nés à terme et prématurés (Reix et al. 2003 ; Reix et al 2004) et chez la brebis adulte (Roberge et al. 2007). Chez l'être humain, les DNN prédominent aussi en sommeil REM, que ce soit chez le nourrisson (Jeffery et al. 2000 ; Page et Jeffery, 1998) ou chez l'adulte (Lichter et Muir, 1975). La prédominance des DNN en sommeil REM est aussi observée durant des stress respiratoires comme l'hypoxie, l'hypercapnie et la FEC, comme démontré dans cette thèse (Duvareille et al. 2007 ; Duvareille et al. 2011). Très peu d'hypothèses sont avancées pour expliquer ces observations répétées d'une plus grande fréquence des DNN en sommeil REM, quelle que soit la condition expérimentale. Certains pensent à tort qu'une augmentation de la sécrétion salivaire est associée (Gemba et al. 1996). L'autre hypothèse avancée est en lien avec l'interconnexion des centres de la respiration et de la déglutition au niveau du tronc cérébral, comme discuté précédemment. En effet, durant le sommeil REM, il a été démontré qu'il existe une hyperventilation relative. Comme pour l'hypercapnie, on est à même de croire que le sommeil REM, en stimulant les centres de la respiration, stimule aussi les centres de la déglutition.

## Chapitre 6 : Implications cliniques et perspectives

Cette thèse portant sur les effets de certains stress environnementaux souvent rencontrés en période néonatale sur la coordination DNN-respiration renforce l'hypothèse de la robustesse de cette fonction pour limiter les risques d'apnées et d'aspirations. Ainsi, ce travail ouvre de nombreuses perspectives tant dans l'approfondissement de l'étude des déglutitions que dans l'utilisation des moyens techniques expérimentaux mis en place.

Sur le plan de l'approfondissement de l'étude des déglutitions, les perspectives sont grandes. En effet, si l'on se rappelle la théorie du triple risque du SMSN présentée en introduction, l'étude des différents facteurs de risques a déjà été faite mais séparément. Il serait donc très intéressant de combiner les risques. Ainsi, on pourrait étudier les DNN chez des agneaux prématurés et soumis à l'hypoxie, l'hypercapnie ou encore à la FEC. De façon plus simpliste, l'étude de stress néonataux plus longs voir chroniques pourrait être envisagée. Cependant, le plus intéressant reste l'étude postnatale de la déglutition chez des agneaux nouveau-nés soumis à la FEC durant la gestation. Bien sûr, avec ce modèle, la combinaison des stress reste aussi possible ou encore l'étude d'un stress aigu comme l'hypoxie sur un animal exposé à la FEC durant la gestation.

Sur le plan expérimental, la mise en place des modèles, notamment la construction de l'ASM offre des perspectives illimitées pour la recherche animale. En effet, l'ASM étant structurellement indépendante de la chambre d'exposition, on peut alors adapter n'importe quel type de chambre pour y exposer des animaux aussi petits que des souris et des animaux aussi grands que des brebis gestantes ou autres espèces incluant les porcs et les singes. Il est évident que la configuration actuelle permet déjà l'étude sur des brebis ou des femelles d'autres espèces gestantes. De façon plus large, ces modèles expérimentaux peuvent aussi nous permettre d'observer les effets de l'hypoxie/hypercapnie et/ou de l'FEC sur d'autres fonctions physiologiques comme les déglutitions nutritives, les chémoréflexes laryngés (St-Hilaire et al. 2010) ou encore la variabilité du rythme cardiaque (études en court d'analyse pour les effets de la FEC)...

## Chapitre 7 : Conclusion

En conclusion, nous pouvons affirmer que la déglutition, très importante en période néonatale, demeure une fonction très robuste, notamment lorsqu'il s'agit de la coordination DNN-respiration. En effet, la première étude de cette thèse a démontré qu'un stress hypercapnique à 5% de CO<sub>2</sub> a la capacité de perturber la fréquence des DNN et la coordination DNN-respiration, alors qu'un stress hypoxique à 10% d'O<sub>2</sub> n'est pas suffisant pour perturber cette coordination. Le deuxième volet de cette thèse, démontre quant à lui l'effet potentiel, léger (à la limite de la significativité) de la FEC sur la coordination DNN-respiration en SC. Cependant, des études non publiées et en cours de publication sur les déglutitions nutritives au sein de notre laboratoire semblent montrer que la déglutition peut être perturbée lors de la combinaison de stress, en accord avec la théorie du triple risque. Ainsi, la fréquence des déglutitions serait modifiée en période néonatale chez l'agneau lors de la combinaison de l'exposition à la FEC avec la laryngite de reflux et la nutrition. Dans une optique très vaste de la compréhension du SMSN, il serait très intéressant dans un avenir proche d'observer les effets de tous les stress ci-dessus mentionnés combinés à la prématurité.

## **REMERCIEMENTS**

### **Au Dr Jean-Paul PRAUD :**

Merci à toi Jean-Paul de m'avoir donné ma chance alors que l'on ne se connaissait pas du tout et de m'avoir accueilli dans ton laboratoire, ta famille. Merci d'être le mentor extraordinaire que tu es tant au niveau de l'enseignement que de la rigueur scientifique ; qualités que tu as su m'inculquer au long de ces huit pas si longues années. Jean-Paul, je te dédie ce travail de thèse comme gage de ma plus profonde reconnaissance qui symbolise pour moi toute l'admiration que je te porte.

### **A Jean-Philippe GAGNE :**

Merci à toi Jean-Philippe pour l'aide technique de tous les jours, de toutes les nuits et fins de semaines passées au laboratoire. Sans ton aide, cette thèse ne serait qu'un rêve resté sur papier au fond d'un tiroir. Je tiens aussi à remercier le Jean-Philippe dit JP devenu un très bon ami. Merci de m'avoir fait découvrir certains aspects du Québec. C'est toujours le fun avoir des loisirs avec toi et la gang de malades que l'on connaît bien (Annabel, Sasha, Cédric et Samuel).

### **Aux étudiants de ce laboratoire :**

Un énorme merci à Nathalie Samson, Marie St-Hilaire, Simon Brisebois, Mylène Lafrance, Anne-Marie Carreau qui m'avez apporté une aide très précieuse dans les expérimentations et les analyses. Je vous considère tous comme non seulement des collègues de travail mais aussi comme de bons amis. MERCI.

### **Aux Québécois :**

A tous les Québécois qui m'ont accueilli parmi eux et qui se reconnaissent. Plus particulièrement à mes coéquipiers de rugby du VERT et OR et des ABENAKIS de Sherbrooke.

**Aux Français :**

Loin des yeux mais très proche de mon cœur. Ma famille directe : papa, maman, Tristan et Fleur, merci de m'avoir soutenu dans ce projet assez fou dans les bons comme dans les mauvais moments. Je vous aime. Mes amis d'enfance du rond point de Genas qui se reconnaîtront ainsi que leur conjointes et nouveaux enfants. Merci à mes amis de fac de France du 6<sup>ème</sup> arrondissement qui ont toujours occupé une grande place dans mon cœur et dans mes choix.

**Je voudrais finir ces remerciements en dédiant cette thèse et en adressant une pensée toute particulière à un ami, je dirai même un être cher avec qui j'ai partagé les galères de la première année ici au Québec. Un personnage haut en couleur toujours joyeux et fonceur que j'ai rencontré sur les bancs de la fac de Lyon en licence de biochimie. Ce grand homme qui a donné sa vie en aidant les autres sur le terrain en Somalie en organisant des convois humanitaires nous a été pris à l'âge de 27 ans le 28 janvier 2008 durant un attentat alors qu'il amenait un homme blessé à l'hôpital.**

**DAMIEN LEHALLE tu resteras toujours pour moi un modèle de simplicité et de générosité. Je te dédie cette thèse mon ami. Je sais que de là-haut tu nous regardes et profites de la vie à travers nos yeux.**

# **REFERENCES**



1. **Alheid GF and McCrimmon DR.** (2008). The chemical neuroanatomy of breathing. *Respir.Physiol.Neurobiol.* 164: 1-2: 3-11.
2. **Altschuler SM.** (2001). Laryngeal and respiratory protective reflexes. *Am.J.Med.* 111 Suppl 8A: 90S-94S.
3. **Altschuler SM, Bao XM, Bieger D, Hopkins DA and Miselis RR.** (1989). Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the rat: sensory ganglia and nuclei of the solitary and spinal trigeminal tracts. *J.Comp.Neurol.* 283: 2: 248-268.
4. **Alves LM, Cassiani Rde A, Santos CM and Dantas RO.** (2007). Gender effect on the clinical measurement of swallowing. *Arq.Gastroenterol.* 44: 3: 227-229.
5. **Anderson HR and Cook DG.** Passive smoking and sudden infant death syndrome: review of the epidemiological evidence. *Thorax* 52: 11: 1003-1009.
6. **Anderson JW, Sant'Ambrogio FB, Orani GP, Sant'Ambrogio G and Mathew OP.** (1997). Carbon dioxide-responsive laryngeal receptors in the dog. *Respir.Physiol.* 82: 2: 217-226, 1990.
7. **Anuntaseree W, Mo-Suwan L, Ovattarnporn C, Tantana C and Ma-a-Lee A.** (2008). Exposure to environmental tobacco smoke among infants in southern Thailand: a study of urinary cotinine. *Bull.EnvIRON. Contam. Toxicol.* 80: 1: 34-37.
8. **Ardran GM and Kemp FH.** (1951). The mechanism of swallowing. *Proc.R.Soc.Med.* 44: 12: 1038-1040.
9. **Ayuse T, Ayuse T, Ishitobi S, Kurata S, Sakamoto E, Okayasu I and Oi K.** (2006). Effect of reclining and chin-tuck position on the coordination between respiration and swallowing. *J.Oral Rehabil.* 33: 6: 402-408.
10. **Bailey EF and Fregosi RF.** (2006). Modulation of upper airway muscle activities by bronchopulmonary afferents. *J.Appl.Physiol.* 101: 2: 609-617.
11. **Bairam A, Kinkead R, Lajeunesse Y and Joseph V.** (2010). Neonatal caffeine treatment does not induce long-term consequences on TrkB receptors or BDNF expression in chemosensory organs of adult rats. *Neurosci.Lett.* 468: 3: 292-296.
12. **Bajanowski T, Vege A, Byard RW, Krous HF, Arnestad M, Bachs L, Banner J, Blair PS, Borthne A, Dettmeyer R, Fleming P, Gaustad P, Gregersen M, Grogaard J, Holter E, Isaksen CV, Jorgensen JV, de Lange C, Madea B, Moore I, Morland J, Opdal SH, Rasten-Almqvist P, Schlaud M, Sidebotham P, Skullerud K, Stoltenburg-Didinger G, Stray-Pedersen A, Sveum L and Rognum TO.** (2007). Sudden infant death syndrome (SIDS)--standardised investigations and classification: recommendations. *Forensic Sci.Int.* 165: 2-3: 129-143.

13. **Barraco R, el-Ridi M, Ergene E, Parizon M and Bradley D.** (1992) An atlas of the rat subpostremal nucleus tractus solitarius. *Brain Res. Bull.* 29: 6: 703-765.
14. **Bartlett D,Jr.** Respiratory functions of the larynx. *Physiol.Rev.* 69: 1: 33-57, 1989.
15. **Bartlett D,Jr and Knuth SL.** (1994). Influence of hypoxia on ventilatory responses to intralaryngeal CO<sub>2</sub> in cats. *Respir.Physiol.* 96: 1: 61-69.
16. **Bartlett D,Jr and Knuth SL.** (1992). Responses of laryngeal receptors to intralaryngeal CO<sub>2</sub> in the cat. *J.Physiol.* 457: 187-193.
17. **Bartlett D,Jr, Knuth SL and Knuth KV.** (1981). Effects of pulmonary stretch receptor blockade on laryngeal responses to hypercapnia and hypoxia. *Respir.Physiol.* 45: 1: 67-77.
18. **Bartlett D,Jr, Knuth SL and Leiter JC.** (1992). Alteration of ventilatory activity by intralaryngeal CO<sub>2</sub> in the cat. *J.Physiol.* 457: 177-185.
19. **Ben Gamra O, Mbarek C, Charfi S, Ouni H, Hariga I, Chedly A, Zribi S and El Khedim A.** (2007). Chronic laryngitis in adults. *Tunis.Med.* 85: 8: 641-643.
20. **Bianchi AL, Denavit-Saubie M and Champagnat J.** (1995). Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol.Rev.* 75: 1: 1-45.
21. **Bianciotti LG, Elverdin JC, Vatta MS, Colatrella C and Fernandez BE.** (1994). Atrial natriuretic factor enhances induced salivary secretion in the rat. *Regul.Pept.* 49: 3: 195-202.
22. **Blackburn CM, Bonas S, Spencer NJ, Coe CJ, Dolan A and Moy R.** (2005). Parental smoking and passive smoking in infants: fathers matter too. *Health Educ.Res.* 20: 2: 185-194.
23. **Blank EL, Greenwood B and Dodds WJ.** (1989). Cholinergic control of smooth muscle peristalsis in the cat esophagus. *Am.J.Physiol.* 257: 4 Pt 1: G517-23.
24. **Bosma JF.** Deglutition: pharyngeal stage. *Physiol.Rev.* 37: 3: 275-300, 1957.
25. **Boushey HA, Richardson PS, Widdicombe JG and Wise JC.** (1974). The response of laryngeal afferent fibres to mechanical and chemical stimuli. *J.Physiol.* 240: 1: 153-175.
26. **Bradford A, McKeogh D and O'Regan RG.** (1998). Laryngeal-receptor responses to phasic CO<sub>2</sub> in anesthetized cats. *J.Appl.Physiol.* 85: 3: 1135-1141.

27. **Bradford A, Nolan P, McKeogh D, Bannon C and O'Regan RG.** (1990). The responses of superior laryngeal nerve afferent fibres to laryngeal airway CO<sub>2</sub> concentration in the anaesthetized cat. *Exp.Physiol.* 75: 2: 267-270.
28. **Bradford A, Nolan P, O'Regan RG and McKeogh D.** (1993). Carbon dioxide-sensitive superior laryngeal nerve afferents in the anaesthetized cat. *Exp.Physiol.* 78: 6: 787-798.
29. **Bradley RM and Mistretta CM.** (1975). Fetal sensory receptors. *Physiol.Rev.* 55: 3: 352-382.
30. **Bradley RM and Mistretta CM.** (1973). Investigations of taste function and swallowing in fetal sheep. *Symp.Oral Sens.Percept.* (4): 4: 185-205.
31. **Bradley RM and Mistretta CM.** (1973). Swallowing in fetal sheep. *Science* 179: 77: 1016-1017.
32. **Bratu I, Flageole H, Laberge JM, Kovacs L, Faucher D and Piedboeuf B.** (2004). Lung function in lambs with diaphragmatic hernia after reversible fetal tracheal occlusion. *J.Pediatr.Surg.* 39: 10: 1524-1531.
33. **Brisebois S, Samson N, Fortier PH, Doueik A, Carreau AM, Gagné JP, Praud JP.** (2010). Effects of reflux laryngitis on non-nutritive swallowing in newborn lambs. *ATS Nouvelle-Orléans.*
34. **Brophy S, Ford TW, Carey M and Jones JF.** (1999). Activity of aortic chemoreceptors in the anaesthetized rat. *J.Physiol.* 514 ( Pt 3): Pt 3: 821-828.
35. **Broussard DL, Li X and Altschuler SM.** (1996). Localization of GABAA alpha 1 mRNA subunit in the brainstem nuclei controlling esophageal peristalsis. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 40: 1: 143-147.
36. **Buchholz J and Duckles SP.** (2001). Chronic hypoxia alters prejunctional alpha(2)-receptor function in vascular adrenergic nerves of adult and fetal sheep. *Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol.* 281: 3: R926-34.
37. **Car A, Roman C and Zoungrana OR.** (2002). Effects of atropine on the central mechanism of deglutition in anesthetized sheep. *Exp.Brain Res.* 142: 4: 496-503.
38. **Carlson GM, Ruddon RW, Hug CC,Jr and Bass P.** (1970). Effects of nicotine on gastric antral and duodenal contractile activity in the dog. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 172: 2: 367-376.
39. **Carlson GM, Ruddon RW, Hug CC,Jr, Schmiede SK and Bass P.** (1970). Analysis of the site of nicotine action on gastric antral and duodenal contractile activity. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 172: 2: 377-383.

40. **Champagnat J, Morin-Surun MP, Fortin G and Thoby-Brisson M.** (2009). Developmental basis of the rostral-caudal organization of the brainstem respiratory rhythm generator. *Philos.Trans.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.* 364: 1529: 2469-2476.
41. **Charbonneau I, Lund JP and McFarland DH.** (2005). Persistence of respiratory-swallowing coordination after laryngectomy. *J.Speech Lang.Hear.Res.* 48: 1: 34-44.
42. **Chattopadhyay DK, Greaney MG and Irvin TT.** (1977). Effect of cigarette smoking on the lower oesophageal sphincter. *Gut* 18: 10: 833-835.
43. **Chaudhuri TK and Fink S.** (1988). Effect of nicotine gum on gastric emptying. *Chest* 94: 5: 1122.
44. **Cheng Z, Powley TL, Schwaber JS and Doyle FJ,3rd.** (1997). A laser confocal microscopic study of vagal afferent innervation of rat aortic arch: chemoreceptors as well as baroreceptors. *J.Auton.Nerv.Syst.* 67: 1-2: 1-14.
45. **Ciampini G and Jean A.** (1980). Role of glossopharyngeal and trigeminal afferents in the initiation and propagation of swallowing. I--Glossopharyngeal afferents (author's transl). *J.Physiol.(Paris)* 76: 1: 49-60.
46. **Coates EL, Li A and Nattie EE.** (1993). Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. *J.Appl.Physiol.* 75: 1: 5-14.
47. **Coates G, O'Brodivich H, Jefferies AL and Gray GW.** (1984). Effects of exercise on lung lymph flow in sheep and goats during normoxia and hypoxia. *J.Clin.Invest.* 74: 1: 133-141.
48. **Collman PI, Tremblay L and Diamant NE.** (1993). The central vagal efferent supply to the esophagus and lower esophageal sphincter of the cat. *Gastroenterology* 104: 5: 1430-1438.
49. **Cook IJ, Dodds WJ, Dantas RO, Kern MK, Massey BT, Shaker R and Hogan WJ.** (1989). Timing of videofluoroscopic, manometric events, and bolus transit during the oral and pharyngeal phases of swallowing. *Dysphagia* 4: 1: 8-15.
50. **Cunningham ET,Jr and Sawchenko PE.** (2000). Dorsal medullary pathways subserving oromotor reflexes in the rat: implications for the central neural control of swallowing. *J.Comp.Neurol.* 417: 4: 448-466.
51. **Dalal PG, Murray D, Messner AH, Feng A, McAllister J and Molter D.** (2009). Pediatric laryngeal dimensions: an age-based analysis. *Anesth.Analg.* 108: 5: 1475-1479.
52. **Dalinghaus M, Gratama JW, Zijlstra WG and Kuipers JR.** (1995). Cardiovascular adjustments to acute hypoxemia superimposed on chronic hypoxemia in lambs. *Am.J.Physiol.* 268: 3 Pt 2: H974-9.

53. **Daniel MM, Lorenzi MC, da Costa Leite C and Lorenzi-Filho G.** (2007). Pharyngeal dimensions in healthy men and women. *Clinics (Sao.Paulo)* 62: 1: 5-10.
54. **Dias MB, Li A and Nattie E.** (2008). Focal CO<sub>2</sub> dialysis in raphe obscurus does not stimulate ventilation but enhances the response to focal CO<sub>2</sub> dialysis in the retrotrapezoid nucleus. *J.Appl.Physiol.* 105: 1: 83-90.
55. **Doty RW.** (1968). Neural organisation of deglutition. 4: 6: 1861-1902.
56. **Doty RW.** (1951). Influence of stimulus pattern on reflex deglutition. *Am.J.Physiol.* 166: 1: 142-158.
57. **Doty RW and Bosma A JF.** (1956). An electromyographic analysis of reflex deglutition. *J.Neurophysiol.* 19: 1: 44-60.
58. **Doty RW, Richmond WH and Storey AT.** (1967). Effect of medullary lesions on coordination of deglutition. *Exp.Neurol.* 17: 1: 91-106.
59. **Dua K, Bardan E, Ren J, Sui Z and Shaker R.** (2002). Effect of chronic and acute cigarette smoking on the pharyngoglottal closure reflex. *Gut* 51: 6: 771-775.
60. **Dua K, Bardan E, Ren J, Sui Z and Shaker R.** (1998). Effect of chronic and acute cigarette smoking on the pharyngo-upper oesophageal sphincter contractile reflex and reflexive pharyngeal swallow. *Gut* 43: 4: 537-541.
61. **Dua KS, Surapaneni SN, Santharam R, Knuff D, Hofmann C and Shaker R.** (2009). Effect of systemic alcohol and nicotine on airway protective reflexes. *Am.J.Gastroenterol.* 104: 10: 2431-2438.
62. **Dubner R, Sessle BJ and Storey AT.** The neural basis of oral and facial function. 483, 1978.
63. **Dumont FS and Kinkead R.** (2010). Neonatal stress and attenuation of the hypercapnic ventilatory response in adult male rats: the role of carotid chemoreceptors and baroreceptors. *Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol.* 299: 5: R1279-89.
64. **Dutschmann M and Herbert H.** (2006). The Kolliker-Fuse nucleus gates the postinspiratory phase of the respiratory cycle to control inspiratory off-switch and upper airway resistance in rat. *Eur.J.Neurosci.* 24: 4: 1071-1084.
65. **Duvarville C, Beaudry B, St-Hilaire M, Boheimier M, Brunel C, Micheau P and Praud JP.** (2010). Validation of a new automatic smoking machine to study the effects of cigarette smoke in newborn lambs. *Lab.Anim.* 44: 4: 290-297.

66. **Duvareille C, Lafrance M, Samson N, St-Hilaire M, Pladys P, Micheau P, Bournival V, Langlois C and Praud JP.** (2007). Effects of hypoxia and hypercapnia on nonnutritive swallowing in newborn lambs. *J.Appl.Physiol.* 103: 4: 1180-1188.
67. **Eckert DJ, Catcheside PG, Stadler DL, McDonald R, Hlavac MC and McEvoy RD.** (2006). Acute sustained hypoxia suppresses the cough reflex in healthy subjects. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 173: 5: 506-511.
68. **Ezure K, Tanaka I and Kondo M.** (2003). Glycine is used as a transmitter by decrementing expiratory neurons of the ventrolateral medulla in the rat. *J.Neurosci.* 23: 26: 8941-8948.
69. **Feldman JL and Del Negro CA.** (2006). Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat.Rev.Neurosci.* 7: 3: 232-242.
70. **Feroah TR, Forster HV, Fuentes CG, Lang IM, Beste D, Martino P, Pan L and Rice T.** (2002). Effects of spontaneous swallows on breathing in awake goats. *J.Appl.Physiol.* 92: 5: 1923-1935.
71. **Filiano JJ and Kinney HC.** (1994). A perspective on neuropathologic findings in victims of the sudden infant death syndrome: the triple-risk model. *Biol.Neonate* 65: 3-4: 194-197.
72. **Fisher JT, Sant'Ambrogio FB and Sant'Ambrogio G.** (1983). Stimulation of tracheal slowly adapting stretch receptors by hypercapnia and hypoxia. *Respir.Physiol.* 53: 3: 325-339.
73. **Gemba H, Teranaka A and Takemura K.** (1996). Influences of emotion upon parotid secretion in human. *Neurosci.Lett.* 211: 3: 159-162.
74. **Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A and Rigual R.** (1994). Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol.Rev.* 74: 4: 829-898.
75. **Goyal RJ and Cobb BW.** (1981). Motility of the pharynx, esophagus and esophageal sphincters. 359-391.
76. **Goyal RJ and Paterson WG.** (1989). Esophageal physiology. 1: 6: 865-908.
77. **Greenwood B, Blank E and Dodds WJ.** (1992). Nicotine stimulates esophageal peristaltic contractions in cats by a central mechanism. *Am.J.Physiol.* 262: 3 Pt 1: G567-71.
78. **Grimes DS and Goddard J.** (1978). Effect of cigarette smoking on gastric emptying. *Br.Med.J.* 2: 6135: 460-461.

79. **Gritz ER, Ippoliti A, Jarvik ME, Rose JE, Shiffman S, Harrison A and Van Vunakis H.** (1988). The effect of nicotine on the delay of gastric emptying. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 2: 2: 173-178.
80. **Guntheroth WG and Spiers PS.** (2002). The triple risk hypotheses in sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 110: 5: e64.
81. **Guslandi M.** (2000). Overview: smoke gets in your gut. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* 12: 8: 833-835.
82. **Guyenet PG.** (2008). The 2008 Carl Ludwig Lecture: retrotrapezoid nucleus, CO2 homeostasis, and breathing automaticity. *J.Appl.Physiol.* 105: 2: 404-416.
83. **Guyenet PG, Stornetta RL, Bayliss DA and Mulkey DK.** (2005). Retrotrapezoid nucleus: a litmus test for the identification of central chemoreceptors. *Exp.Physiol.* 90: 3: 247-53; discussion 253-7.
84. **Hafstrom O, Milerad J, Sandberg KL and Sundell HW.** (2005). Cardiorespiratory effects of nicotine exposure during development. *Respir.Physiol.Neurobiol.* 149: 1-3: 325-341.
85. **Hamdy S, Aziz Q, Rothwell JC, Singh KD, Barlow J, Hughes DG, Tallis RC and Thompson DG.** (1996). The cortical topography of human swallowing musculature in health and disease. *Nat.Med.* 2: 11: 1217-1224.
86. **Hanacek J, Tatar M and Widdicombe J.** (2006). Regulation of cough by secondary sensory inputs. *Respir.Physiol.Neurobiol.* 152: 3: 282-297.
87. **Haxhiu MA, Chang CH, Dreshaj IA, Erokwu B, Prabhakar NR and Cherniack NS.** (1995). Nitric oxide and ventilatory response to hypoxia. *Respir.Physiol.* 101: 3: 257-266.
88. **Haxhiu MA, Strohl KP and Cherniack NS.** (1995). The N-methyl-D-aspartate receptor pathway is involved in hypoxia-induced c-Fos protein expression in the rat nucleus of the solitary tract. *J.Auton.Nerv.Syst.* 55: 1-2: 65-68.
89. **Herrera EA, Pulgar VM, Riquelme RA, Sanhueza EM, Reyes RV, Ebensperger G, Parer JT, Valdez EA, Giussani DA, Blanco CE, Hanson MA and Llanos AJ.** (2007). High-altitude chronic hypoxia during gestation and after birth modifies cardiovascular responses in newborn sheep. *Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol.* 292: 6: R2234-40.
90. **Heymans C and Bouckaert JJ.** (1930). Sinus caroticus and respiratory reflexes: I. Cerebral blood flow and respiration. Adrenaline apnoea. *J.Physiol.* 69: 2: 254-266.

91. **Hilaire G and Duron B.** (1999). Maturation of the mammalian respiratory system. *Physiological Review.* 79: 325-360.
92. **Hislop AA, Springall DR, Oliveira H, Pollock JS, Polak JM and Haworth SG.** (1997). Endothelial nitric oxide synthase in hypoxic newborn porcine pulmonary vessels. *Arch.Dis.Child.Fetal Neonatal Ed.* 77: 1: F16-22.
93. **Hiss SG, Strauss M, Treole K, Stuart A and Boutilier S.** (2003). Swallowing apnea as a function of airway closure. *Dysphagia* 18: 4: 293-300.
94. **Hiss SG, Treole K and Stuart A.** (2001). Effects of age, gender, bolus volume, and trial on swallowing apnea duration and swallow/respiratory phase relationships of normal adults. *Dysphagia* 16: 2: 128-135.
95. **Holgert H, Hökfelt T, Hertzberg T and Lagercrantz H.** (1995). Functional and developmental studies of the peripheral arterial chemoreceptors in rat: effects of nicotine and possible relation to sudden infant death syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1;92(16):7575-9.
96. **Holstege G, Kuypers HG and Dekker JJ.** (1977). The organization of the bulbar fibre connections to the trigeminal, facial and hypoglossal motor nuclei. II. An autoradiographic tracing study in cat. *Brain* 100: 2: 264-286.
97. **Hooker D.** (1954). Early human fetal behavior, with a preliminary note on double simultaneous fetal stimulation. *Res.Publ.Assoc.Res.Nerv.Ment.Dis.* 33: 98-113.
98. **Horn EM and Waldrop TG.** (1997). Oxygen-sensing neurons in the caudal hypothalamus and their role in cardiorespiratory control. *Respir.Physiol.* 110: 2-3: 219-228.
99. **Hrycyshyn AW and Basmajian JV.** (1972). Electromyography of the oral stage of swallowing in man. *Am.J.Anat.* 133: 3: 333-340.
100. **Humphrey T.** (1964). Some correlations between the appearance of human fetal reflexes and the development of the nervous system. 4: 93-135.
101. **Hunt CE.** (2005). Gene-environment interactions: implications for sudden unexpected deaths in infancy. *Arch.Dis.Child.* 90: 1: 48-53.
102. **Hunt CE and Hauck FR.** (2006). Sudden infant death syndrome. *CMAJ* 174: 13: 1861-1869.
103. **Jacob P, Kahrilas PJ, Logemann JA, Shah V and Ha T.** (1989). Upper esophageal sphincter opening and modulation during swallowing. *Gastroenterology* 97: 6: 1469-1478,.
104. **Jammes Y, Fornaris E, Mei N and Barrat E.** (1982). Afferent and efferent components of the bronchial vagal branches in cats. *J.Auton.Nerv.Syst.* 5: 2: 165-176.



105. **Janczewski WA and Feldman JL.** (2006). Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. *J.Physiol.* 570: Pt 2: 407-420.
106. **Jean A.** (2001). Brain stem control of swallowing: neuronal network and cellular mechanisms. *Physiol.Rev.* 81: 2: 929-969.
107. **Jean A.** (1990). Brainstem control of swallowing: localization and organization of the central pattern generator for swallowing. 294-321.
108. **Jean A, Amri M and Calas A.** (1983). Connections between the ventral medullary swallowing area and the trigeminal motor nucleus of the sheep studied by tracing techniques. *J.Auton.Nerv.Syst.* 7: 2: 87-96.
109. **Jean A and Car A.** (1979). Inputs to the swallowing medullary neurons from the peripheral afferent fibers and the swallowing cortical area. *Brain Res.* 178: 2-3: 567-572.
110. **Jean A, Car A and Roman C.** (1975). Comparison of activity in pontine versus medullary neurones during swallowing. *Exp.Brain Res.* 22: 2: 211-220.
111. **Jeffery HE, Ius D and Page M.** (2000). The role of swallowing during active sleep in the clearance of reflux in term and preterm infants. *J.Pediatr.* 137: 4: 545-548.
112. **Johnson RD, Horowitz M, Maddox AF, Wishart JM and Shearman DJ.** (1991). Cigarette smoking and rate of gastric emptying: effect on alcohol absorption. *BMJ* 302: 67: 20-23.
113. **Johnson SM, Koshiya N and Smith JC.** (2001). Isolation of the kernel for respiratory rhythm generation in a novel preparation: the pre-Botzinger complex "island". *J.Neurophysiol.* 85: 4: 1772-1776.
114. **Joseph DV, Jackson JA, Westaway J, Taub NA, Petersen SA and Wailoo MP.** (2007). Effect of parental smoking on cotinine levels in newborns. *Arch.Dis.Child.Fetal Neonatal Ed.* 92: 6: F484-8.
115. **Kahrilas PJ and Gupta RR.** (1990). Mechanisms of acid reflux associated with cigarette smoking. *Gut* 31: 1: 4-10.
116. **Kahrilas PJ, Lin S, Logemann JA, Ergun GA and Facchini F.** (1993). Deglutitive tongue action: volume accommodation and bolus propulsion. *Gastroenterology* 104: 1: 152-162.
117. **Kawai Y, Qi J, Comer AM, Gibbons H, Win J and Lipski J.** (1999). Effects of cyanide and hypoxia on membrane currents in neurones acutely dissociated from the rostral ventrolateral medulla of the rat. *Brain Res.* 830: 2: 246-257.

118. **Kawasaki M, Ogura JH and Takenouchi S.** (1964). Neurophysiologic Observations of Normal Deglutition. II. its Relationship to Allied Phenomena. *Laryngoscope* 74: 1766-1780.
119. **Kelly BN, Huckabee ML, Frampton CM and Jones RD.** (2008). Arousal has no effect on non-nutritive breathing-swallowing coordination during the first year of human life. *Int.J.Dev.Neurosci.* 26: 5: 385-390.
120. **Kelly BN, Huckabee ML, Jones RD and Carroll GJ.** (2007). The influence of volition on breathing-swallowing coordination in healthy adults. *Behav.Neurosci.* 121: 6: 1174-1179.
121. **Kelly BN, Huckabee ML, Jones RD and Frampton CM.** (2007). The early impact of feeding on infant breathing-swallowing coordination. *Respir.Physiol.Neurobiol.* 156: 2: 147-153.
122. **Kelly BN, Huckabee ML, Jones RD and Frampton CM.** (2007). The first year of human life: coordinating respiration and nutritive swallowing. *Dysphagia* 22: 1: 37-43.
123. **Kelly PT, Secombe LM, Rogers PG and Peters MJ** (2007). Directly measured cabin pressure conditions during Boeing 747-400 commercial aircraft flights. *Respirology.* 12(4):511-5.
124. **Kelly BN, Huckabee ML, Jones RD and Frampton CM.** (2006). Nutritive and non-nutritive swallowing apnea duration in term infants: implications for neural control mechanisms. *Respir.Physiol.Neurobiol.* 154: 3: 372-378.
125. **Kessler JP and Jean A.** (1991). Evidence that activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors within the nucleus tractus solitarii triggers swallowing. *Eur.J.Pharmacol.* 201: 1: 59-67.
126. **Kessler JP, Cherkaoui N, Catalin D and Jean A.** (1990). Swallowing responses induced by microinjection of glutamate and glutamate agonists into the nucleus tractus solitarius of ketamine-anesthetized rats. *Exp.Brain Res.* 83: 1: 151-158.
127. **Kessler JP and Jean A.** (1985). Identification of the medullary swallowing regions in the rat. *Exp.Brain Res.* 57: 2: 256-263.
128. **Kianicka I, Diaz V, Dorion D and Praud JP.** (1998). Coordination between glottic adductor muscle and diaphragm EMG activity in fetal lambs in utero. *J.Appl.Physiol.* 84: 5: 1560-1565.
129. **Kim YH, Veille JC, Cho MK, Kang MS, Kim CH, Song TB and Figueroa JP.** (2005). Chronic hypoxia alters vasoconstrictive responses of femoral artery in the fetal sheep. *J.Korean Med.Sci.* 20: 1: 13-19.

130. **Kingan PS.** (2003). Sleep-related sleeping disorder : Neonatal models and ventilatory behavior. Edited by David W. Carley and Miodrag Radulovacki, chapter 9 : 239-264.
131. **Kinkead R, Montandon G, Bairam A, Lajeunesse Y and Horner R.** (2009). Neonatal maternal separation disrupts regulation of sleep and breathing in adult male rats. *Sleep* 32: 12: 1611-1620.
132. **Kinney HC.** (2005). Abnormalities of the brainstem serotonergic system in the sudden infant death syndrome: a review. *Pediatr.Dev.Pathol.* 8: 5: 507-524.
133. **Kinney HC, Richerson GB, Dymecki SM, Darnall RA and Nattie EE.** (2009). The brainstem and serotonin in the sudden infant death syndrome. *Annu.Rev.Pathol.* 4: 517-550.
134. **Koizumi H and Smith JC.** (2008). Persistent Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>-dominated leak currents contribute to respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex in vitro. *J.Neurosci.* 28: 7: 1773-1785.
135. **Koshiya N and Smith JC.** (1999). Neuronal pacemaker for breathing visualized in vitro. *Nature* 400: 6742: 360-363.
136. **Kott KS, Salt BH, McDonald RJ, Jhavar S, Bric JM and Joad JP.** (2008). Effect of secondhand cigarette smoke, RSV bronchiolitis and parental asthma on urinary cysteinyl LTE<sub>4</sub>. *Pediatr.Pulmonol.* 43: 8: 760-766.
137. **Kramer K, Kinter L, Brockway BP, Voss HP, Remie R and Van Zutphen BL.** (2001). The use of radiotelemetry in small laboratory animals: recent advances. *Contemp.Top.Lab.Anim.Sci.* 40: 1: 8-16.
138. **Kramer K and Kinter LB.** (2003). Evaluation and applications of radiotelemetry in small laboratory animals. *Physiol.Genomics* 13: 3: 197-205.
139. **Kum-Nji P, Meloy L and Herrod HG.** (2006). Environmental tobacco smoke exposure: prevalence and mechanisms of causation of infections in children. *Pediatrics* 117: 5: 1745-1754.
140. **Kuwana S, Tsunekawa N, Yanagawa Y, Okada Y, Kuribayashi J and Obata K.** (2006). Electrophysiological and morphological characteristics of GABAergic respiratory neurons in the mouse pre-Botzinger complex. *Eur.J.Neurosci.* 23: 3: 667-674.
141. **Kuypers HG.** (1958). An anatomical analysis of cortico-bulbar connexions to the pons and lower brain stem in the cat. *J.Anat.* 92: 2: 198-218.
142. **Kuypers HG.** (1958). Corticobular connexions to the pons and lower brain-stem in man: an anatomical study. *Brain* 81: 3: 364-388.

143. **Kuypers HG.** (1958). Some projections from the peri-central cortex to the pons and lower brain stem in monkey and chimpanzee. *J.Comp.Neurol.* 110: 2: 221-255.
144. **Lang IM, Dean C, Medda BK, Aslam M and Shaker R.** (2004). Differential activation of medullary vagal nuclei during different phases of swallowing in the cat. *Brain Res.* 1014: 1-2: 145-163.
145. **Lee LY.** (2009). Respiratory sensations evoked by activation of bronchopulmonary C-fibers. *Respir.Physiol.Neurobiol.* 167: 1: 26-35.
146. **Letourneau P, Dumont S, Kianicka I, Diaz V, Dorion D, Drolet R and Praud JP.** (1999). Radiotelemetry system for apnea study in lambs. *Respir.Physiol.* 116: 1: 85-93.
147. **Letourneau P and Praud JP.** (2003). A radiotelemetry system for polysomnographic recordings in lambs. *Methods* 30: 2: 115-121.
148. **Lewis DJ.** (1981). The use of horseradish peroxidase to demonstrate degenerate cells in rat larynx after acute tobacco smoke exposure. *Toxicol.Lett.* 9: 3: 195-199.
149. **Lewis J, Bachoo M, Polosa C and Glass L.** (1990). The effects of superior laryngeal nerve stimulation on the respiratory rhythm: phase-resetting and aftereffects. *Brain Res.* 517: 1-2: 44-50.
150. **Li A and Nattie E.** (2002). CO<sub>2</sub> dialysis in one chemoreceptor site, the RTN: stimulus intensity and sensitivity in the awake rat. *Respir.Physiol.Neurobiol.* 133: 1-2: 11-22.
151. **Li A, Randall M and Nattie EE.** (1999). CO<sub>2</sub> microdialysis in retrotrapezoid nucleus of the rat increases breathing in wakefulness but not in sleep. *J.Appl.Physiol.* 87: 3: 910-919.
152. **Li YQ, Takada M and Mizuno N.** (1993). Identification of premotor interneurons which project bilaterally to the trigeminal motor, facial or hypoglossal nuclei: a fluorescent retrograde double-labeling study in the rat. *Brain Res.* 611: 1: 160-164.
153. **Lichter I and Muir RC.** (1975). The pattern of swallowing during sleep. *Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol.* 38: 4: 427-432.
154. **Liebrechts-Akkerman G, Lao O, Liu F, van Sleuwen BE, Engelberts AC, L'hoir MP, Tiemeier HW and Kayser M.** (2011). Postnatal parental smoking: an important risk factor for SIDS. *Eur.J.Pediatr.* 170: 10: 1281-1291.
155. **Litman RS, Weissend EE, Shibata D and Westesson PL.** (2003). Developmental changes of laryngeal dimensions in unparalyzed, sedated children. *Anesthesiology* 98: 1: 41-45.

156. **Logemann JA, Pauloski BR, Rademaker AW and Kahrilas PJ.** (2002). Oropharyngeal swallow in younger and older women: videofluoroscopic analysis. *J.Speech Lang.Hear.Res.* 45: 3: 434-445.
157. **Logemann JA, Rademaker AW, Pauloski BR, Ohmae Y and Kahrilas PJ.** (1998). Normal swallowing physiology as viewed by videofluoroscopy and videoendoscopy. *Folia Phoniater.Logop.* 50: 6: 311-319.
158. **Lu W, Zhang M, Neuman RS and Bieger D.** (1997). Fictive oesophageal peristalsis evoked by activation of muscarinic acetylcholine receptors in rat nucleus tractus solitarii. *Neurogastroenterol.Motil.* 9: 4: 247-256.
159. **Lu WY and Bieger D.** (1998). Vagovagal reflex motility patterns of the rat esophagus. *Am.J.Physiol.* 274: 5 Pt 2: R1425-35.
160. **Maity P, Biswas K, Roy S, Banerjee RK and Bandyopadhyay U.** (2003). Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer--recent mechanistic update. *Mol.Cell.Biochem.* 253: 1-2: 329-338.
161. **Malhotra A, Huang Y, Fogel RB, Pillar G, Edwards JK, Kikinis R, Loring SH and White DP.** (2002). The male predisposition to pharyngeal collapse: importance of airway length. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 166: 10: 1388-1395.
162. **Martin BJ, Logemann JA, Shaker R and Dodds WJ.** (1994). Coordination between respiration and swallowing: respiratory phase relationships and temporal integration. *J.Appl.Physiol.* 76: 2: 714-723.
163. **Martin RE and Sessle BJ.** (1993). The role of the cerebral cortex in swallowing. *Dysphagia* 8: 3: 195-202.
164. **Martin-Harris B, Brodsky MB, Michel Y, Ford CL, Walters B and Heffner J.** (2005). Breathing and swallowing dynamics across the adult lifespan. *Arch.Otolaryngol.Head.Neck.Surg.* 131: 9: 762-770.
165. **Martin-Harris B, Brodsky MB, Price CC, Michel Y and Walters B.** (2003). Temporal coordination of pharyngeal and laryngeal dynamics with breathing during swallowing: single liquid swallows. *J.Appl.Physiol.* 94: 5: 1735-1743.
166. **Matt GE, Quintana PJ, Hovell MF, Bernert JT, Song S, Novianti N, Juarez T, Floro J, Gehrman C, Garcia M and Larson S.** (2004). Households contaminated by environmental tobacco smoke: sources of infant exposures. *Tob.Control* 13: 1: 29-37.
167. **McConnel FM, Cerenko D and Mendelsohn MS.** (1988). Manofluorographic analysis of swallowing. *Otolaryngol.Clin.North Am.* 21: 4: 625-635.

168. **McConnel FM, Mendelsohn MS and Logemann JA.** (1986). Examination of swallowing after total laryngectomy using manofluorography. *Head Neck Surg.* 9: 1: 3-12.
169. **McFarland DH and Lund JP.** (1993). An investigation of the coupling between respiration, mastication, and swallowing in the awake rabbit. *J.Neurophysiol.* 69: 1: 95-108.
170. **McFarland DH, Lund JP and Gagner M.** (1994). Effects of posture on the coordination of respiration and swallowing. *J.Neurophysiol.* 72: 5: 2431-2437.
171. **Menon AP, Schefft GL and Thach BT.** (1984). Frequency and significance of swallowing during prolonged apnea in infants. *Am.Rev.Respir.Dis.* 130: 6: 969-973.
172. **Miller AJ.** (1982). Deglutition. *Physiol.Rev.* 62: 1: 129-184.
173. **Miller AJ.** (1972). Characteristics of the swallowing reflex induced by peripheral nerve and brain stem stimulation. *Exp.Neurol.* 34: 2: 210-222.
174. **Miller G, Palmer KR, Smith B, Ferrington C and Merrick MV.** (1989). Smoking delays gastric emptying of solids. *Gut* 30: 1: 50-53.
175. **Minei LJ and Suzuki K.** (1976). Role of fetal deglutition and micturition in the production and turnover of amniotic fluid in the monkey. *Obstet.Gynecol.* 48: 2: 177-181.
176. **Mistretta CM and Bradley RM.** (1975). Taste and swallowing in utero. *Br.Med.Bull.* 31: 1: 80-84.
177. **Montandon G, Horner RL, Kinkead R and Bairam A.** (2009). Caffeine in the neonatal period induces long-lasting changes in sleep and breathing in adult rats. *J.Physiol.* 587: Pt 22: 5493-5507.
178. **Monteau R and Hilaire G.** (1991). Spinal respiratory motoneurons. *Prog.Neurobiol.* 37: 2: 83-144.
179. **Moon RY and Fu LY.** (2007). Sudden infant death syndrome. *Pediatr.Rev.* 28: 6: 209-214.
180. **Morest DK.** (1967). Experimental study of the projections of the nucleus of the tractus solitarius and the area postrema in the cat. *J.Comp.Neurol.* 130: 4: 277-300.
181. **Mortola JP, Morgan CA and Virgona V.** (1986). Respiratory adaptation to chronic hypoxia in newborn rats. *J.Appl.Physiol.* 61: 4: 1329-1336.
182. **Mouadeb DA, Belafsky PC, Birchall M, Hood C, Konia T and Pinkerton KE.** (2009). The effects of allergens and tobacco smoke on the laryngeal mucosa of guinea pigs. *Otolaryngol.Head Neck Surg.* 140: 4: 493-497.

183. **Mrini A and Jean A.** (1995). Synaptic organization of the interstitial subdivision of the nucleus tractus solitarii and of its laryngeal afferents in the rat. *J.Comp.Neurol.* 355: 2: 221-236.
184. **Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA and Guyenet PG.** (2004). Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat.Neurosci.* 7: 12: 1360-1369.
185. **Nattie E.** (1999). CO<sub>2</sub>, brainstem chemoreceptors and breathing. *Prog.Neurobiol.* 59: 4: 299-331
186. **Nattie EE.** (2001). Chemoreception and tonic drive in the retrotrapezoid nucleus (RTN) region of the awake rat: bicuculline and muscimol dialysis in the RTN. *Adv.Exp.Med.Biol.* 499: 27-32.
187. **Nattie EE and Li A.** (2002). CO<sub>2</sub> dialysis in nucleus tractus solitarius region of rat increases ventilation in sleep and wakefulness. *J.Appl.Physiol.* 92: 5: 2119-2130.
188. **Nattie EE and Li A.** (2001). CO<sub>2</sub> dialysis in the medullary raphe of the rat increases ventilation in sleep. *J.Appl.Physiol.* 90: 4: 1247-1257.
189. **Nattie G and Li A.** (2008). Multiple central chemoreceptor sites: cell types and function in vivo. *Adv.Exp.Med.Biol.* 605: 343-347.
190. **Neubauer JA and Sunderram J.** (2004). Oxygen-sensing neurons in the central nervous system. *J.Appl.Physiol.* 96: 1: 367-374.
191. **Nguyen RP, Shah LM, Quigley EP, Harnsberger HR and Wiggins RH** (2011). Carotid body detection on CT angiography. *Am J Neuroradiol.* ;32(6):1096-9.
192. **Nijland MJ, Chao CR and Ross MG.** (1997). Anticholinergic suppression of ovine fetal swallowing activity. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 177: 5: 1105-1112.
193. **Nishino T, Hasegawa R, Ide T and Isono S.** (1998). Hypercapnia enhances the development of coughing during continuous infusion of water into the pharynx. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 157: 3 Pt 1: 815-821.
194. **Nishino T, Honda Y, Kohchi T, Shirahata M and Yonezawa T.** (1985). Effects of increasing depth of anaesthesia on phrenic nerve and hypoglossal nerve activity during the swallowing reflex in cats. *Br.J.Anaesth.* 57: 2: 208-213.
195. **Nishino T, Kohchi T, Honda Y, Shirahata M and Yonezawa T.** (1986). Differences in the effects of hypercapnia and hypoxia on the swallowing reflex in cats. *Br.J.Anaesth.* 58: 8: 903-908.

196. **Nishino T, Yonezawa T and Honda Y.** (1985). Effects of swallowing on the pattern of continuous respiration in human adults. *Am.Rev.Respir.Dis.* 132: 6: 1219-1222.
197. **Nixon GM, Charbonneau I, Kermack AS, Brouillette RT and McFarland DH.** (2008). Respiratory-swallowing interactions during sleep in premature infants at term. *Respir.Physiol.Neurobiol.* 160: 1: 76-82.
198. **Nolan P, Bradford A, O'Regan RG and McKeogh D.** (1990). The effects of changes in laryngeal airway CO<sub>2</sub> concentration on genioglossus muscle activity in the anaesthetized cat. *Exp.Physiol.* 75: 2: 271-274.
199. **Nowak A, Jonderko K, Kaczor R, Nowak S and Skrzypek D.** (1987). Cigarette smoking delays gastric emptying of a radiolabelled solid food in healthy smokers. *Scand.J.Gastroenterol.* 22: 1: 54-58.
200. **Onimaru H, Arata A and Homma I.** (1997). Neuronal mechanisms of respiratory rhythm generation: an approach using in vitro preparation. *Jpn.J.Physiol.* 47: 5: 385-403.
201. **Onimaru H and Homma I.** (2006). Point: Counterpoint: The parafacial respiratory group (pFRG)/pre-Botzinger complex (preBotC) is the primary site of respiratory rhythm generation in the mammal. Point: the PFRG is the primary site of respiratory rhythm generation in the mammal. *J.Appl.Physiol.* 100: 6: 2094-2095.
202. **Pace RW, Mackay DD, Feldman JL and Del Negro CA.** (2007). Inspiratory bursts in the preBotzinger complex depend on a calcium-activated non-specific cation current linked to glutamate receptors in neonatal mice. *J.Physiol.* 582: Pt 1: 113-125.
203. **Page M and Jeffery HE.** (1998). Airway protection in sleeping infants in response to pharyngeal fluid stimulation in the supine position. *Pediatr.Res.* 44: 5: 691-698.
204. **Palmer JB and Hiitemae KM.** (2003). Eating and breathing: interactions between respiration and feeding on solid food. *Dysphagia* 18: 3: 169-178.
205. **Pandolfino JE and Kahrilas PJ.** (2000). Smoking and gastro-oesophageal reflux disease. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* 12: 8: 837-842.
206. **Paydarfar D, Eldridge FL and Kiley JP.** (1986). Resetting of mammalian respiratory rhythm: existence of a phase singularity. *Am.J.Physiol.* 250: 4 Pt 2: R721-7.
207. **Peleg D and Goldman JA.** (1978). Fetal deglutition: a study of the anencephalic fetus. *Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.* 8: 3: 133-136.
208. **Pequignot JM and Hellstrom S.** (1983). Intact and sympathectomized carotid bodies of long-term hypoxic rats. A morphometric light microscopical study. *Virchows Arch.A Pathol.Anat.Histopathol.* 400: 3: 235-243.



209. **Petring OU, Adelhoj B, Ibsen M, Brynnum J and Poulsen HE.** (1985). Abstaining from cigarette smoking has no major effect on gastric emptying in habitual smokers. *Br.J.Anaesth.* 57: 11: 1104-1106.
210. **Pickens DL, Schefft G and Thach BT.** (1988). Prolonged apnea associated with upper airway protective reflexes in apnea of prematurity. *Am.Rev.Respir.Dis.* 137: 1: 113-118.
211. **Pickens DL, Schefft GL and Thach BT.** (1989). Pharyngeal fluid clearance and aspiration preventive mechanisms in sleeping infants. *J.Appl.Physiol.* 66: 3: 1164-1171.
212. **Pilardeau P, Richalet JP, Bouissou P, Vaysse J, Larmignat P and Boom A.** (1990). Saliva flow and composition in humans exposed to acute altitude hypoxia. *Eur.J.Appl.Physiol.Occup.Physiol.* 59: 6: 450-453.
213. **Poets CF.** (2004). Gastroesophageal reflux: a critical review of its role in preterm infants. *Pediatrics* 113: 2: e128-32.
214. **Potts JT, Rybak IA and Paton JF.** (2005). Respiratory rhythm entrainment by somatic afferent stimulation. *J.Neurosci.* 25: 8: 1965-1978.
215. **Preiksaitis HG, Mayrand S, Robins K and Diamant NE.** (1992). Coordination of respiration and swallowing: effect of bolus volume in normal adults. *Am.J.Physiol.* 263: 3 Pt 2: R624-30.
216. **Pritchard JA.** (1965). Deglutition by Normal and Anencephalic Fetuses. *Obstet.Gynecol.* 25: 289-297.
217. **Prodhan P, Sharoor-Karni S, Lin J and Noviski N.** (2010). Predictors of respiratory failure among previously healthy children with respiratory syncytial virus infection. *Am.J.Emerg.Med.*
218. **Pulgar VM, Hong JK, Jessup JA, Massmann AG, Diz DI and Figueroa JP.** (2009). Mild chronic hypoxemia modifies expression of brain stem angiotensin peptide receptors and reflex responses in fetal sheep. *Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol.* 297: 2: R446-52.
219. **Pulgar VM, Zhang J, Massmann GA and Figueroa JP.** (2007). Mild chronic hypoxia modifies the fetal sheep neural and cardiovascular responses to repeated umbilical cord occlusion. *Brain Res.* 1176: 18-26.
220. **Ramirez JM and Richter DW.** (1996). The neuronal mechanisms of respiratory rhythm generation. *Curr.Opin.Neurobiol.* 6: 6: 817-825.

221. **Rasch S, Sangild PT, Gregersen H, Schmidt M, Omari T and Lau C.** (2010). The preterm piglet - a model in the study of oesophageal development in preterm neonates. *Acta Paediatr.* 99: 2: 201-208.
222. **Reix P, Arsenault J, Dome V, Fortier PH, Lafond JR, Moreau-Bussiere F, Dorion D and Praud JP.** (2003). Active glottal closure during central apneas limits oxygen desaturation in premature lambs. *J.Appl.Physiol.* 94: 5: 1949-1954.
223. **Reix P, Arsenault J, Langlois C, Niyonsenga T and Praud JP.** (2004). Nonnutritive swallowing and respiration relationships in preterm lambs. *J.Appl.Physiol.* 97: 4: 1283-1290.
224. **Reix P, Fortier PH, Niyonsenga T, Arsenault J, Letourneau P and Praud JP.** (2003). Non-nutritive swallowing and respiration coordination in full-term newborn lambs. *Respir.Physiol.Neurobiol.* 134: 3: 209-218.
225. **Reix P, St-Hilaire M and Praud JP.** (2007). Laryngeal sensitivity in the neonatal period: from bench to bedside. *Pediatr.Pulmonol.* 42: 8: 674-682.
226. **Robbins J, Hamilton JW, Lof GL and Kempster GB.** (1992). Oropharyngeal swallowing in normal adults of different ages. *Gastroenterology* 103: 3: 823-829.
227. **Roberge S, Samson N, Dorion S, Dorion D and Praud JP.** (2007). Non-nutritive swallowing and respiration coordination among states of alertness in adult sheep. *J.Otolaryngol.* 36: 3: 140-147.
228. **Ross CA, Ruggiero DA and Reis DJ.** (1985). Projections from the nucleus tractus solitarius to the rostral ventrolateral medulla. *J.Comp.Neurol.* 242: 4: 511-534.
229. **Rossiter CD, Norman WP, Jain M, Hornby PJ, Benjamin S and Gillis RA.** (1990). Control of lower esophageal sphincter pressure by two sites in dorsal motor nucleus of the vagus. *Am.J.Physiol.* 259: 6 Pt 1: G899-906.
230. **Rybak IA, Abdala AP, Markin SN, Paton JF and Smith JC.** (2007). Spatial organization and state-dependent mechanisms for respiratory rhythm and pattern generation. *Prog.Brain Res.* 165: 201-220.
231. **Saada J, Oudrhiri N, Bonnard A, de Lagausie P, Aissaoui A, Hauchecorne M, Oury JF, Aigrain Y, Peuchmaur M, Lehn JM, Lehn P and Luton D.** (2010). Combining keratinocyte growth factor transfection into the airways and tracheal occlusion in a fetal sheep model of congenital diaphragmatic hernia. *J.Gene Med.* 12: 5: 413-422.
232. **Saito Y, Ezure K and Tanaka I.** (2002). Swallowing-related activities of respiratory and non-respiratory neurons in the nucleus of solitary tract in the rat. *J.Physiol.* 540: Pt 3: 1047-1060.

233. **Salvador J, Villalbi JR, Nebot M and Borrell C.** (2004). Exposure to smoking during pregnancy: Barcelona (Spain) 1994-2001. *An Pediatr.(Barc)* 60: 2: 139-141.
234. **Samson N, Clapperton V, McFarland D, Praud JP.** (2009), Non-nutritive swallowing-breathing coordination is influenced by gender and by whole body posture. *Am J Crit care Respir Med.* 179: A3588
235. **Samson N, St-Hilaire M, Nsegbe E, Reix P, Moreau-Bussiere F and Praud JP.** (2005). Effect of nasal continuous or intermittent positive airway pressure on nonnutritive swallowing in the newborn lamb. *J.Appl.Physiol.* 99: 5: 1636-1642.
236. **Samson N, Roy B, Ouimet A, Moreau-Bussiere F, Dorion D, Mayer S and Praud JP.** (2008). Origins of the inhibiting effects of nasal CPAP on nonnutritive swallowing in newborn lambs. *J.Appl.Physiol.* 105: 4: 1083-1090.
237. **Samson N, Dumont S, Specq ML, Praud JP.** (2011) Radio telemetry devices to monitor breathing in non-sedated animals. *Respir Physiol Neurobiol.* 15;179(2-3):111-8.
238. **Sang Q and Goyal RK.** (2001) Swallowing reflex and brain stem neurons activated by superior laryngeal nerve stimulation in the mouse. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 280: 2: G191-200.
239. **Sant'Ambrogio G.** (1996). Role of the larynx in cough. *Pulm.Pharmacol.* 9: 5-6: 379-382.
240. **Sant'Ambrogio G.** (1982). Information arising from the tracheobronchial tree of mammals. *Physiol.Rev.* 62: 2: 531-569.
241. **Schaeffer KE.** (1979). Physiological stresses related to hypercapnia during patrols on submarines. *Undersea Biomed.Res.* 6 Suppl: S15-47.
242. **Selley WG, Flack FC, Ellis RE and Brooks WA.** (1989). Respiratory patterns associated with swallowing: Part 1. The normal adult pattern and changes with age. *Age Ageing* 18: 3: 168-172.
243. **Shaker R, Li Q, Ren J, Townsend WF, Dodds WJ, Martin BJ, Kern MK and Rynders A.** (1992). Coordination of deglutition and phases of respiration: effect of aging, tachypnea, bolus volume, and chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Physiol.* 263: 5 Pt 1: G750-5.
244. **Smith J, Wolkove N, Colacone A and Kreisman H.** (1989). Coordination of eating, drinking and breathing in adults. *Chest* 96: 3: 578-582.
245. **Smith JC, Abdala AP, Koizumi H, Rybak IA and Paton JF.** (2007). Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms. *J.Neurophysiol.* 98: 6: 3370-3387.

246. **Smith JC, Abdala AP, Rybak IA and Paton JF.** (2009). Structural and functional architecture of respiratory networks in the mammalian brainstem. *Philos.Trans.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.* 364: 1529: 2577-2587.
247. **Snelderwaard PC, van Ginneken V, Witte F, Voss HP and Kramer K.** (2006). Surgical procedure for implanting a radiotelemetry transmitter to monitor ECG, heart rate and body temperature in small *Carassius auratus* and *Carassius auratus gibelio* under laboratory conditions. *Lab.Anim.* 40: 4: 465-468.
248. **Stanciu C and Bennett JR.** (1972). The effect of smoking on gastroesophageal reflux. *Gut* 13: 4: 318.
249. **Stanciu C and Bennett JR.** (1972). Smoking and gastro-oesophageal reflux. *Br.Med.J.* 3: 5830: 793-795.
250. **Stathopoulos E, Rolland PH, Hery G, de Magnee C, Paut O, Couchot E, Lepretre O, Guys JM and de Lagausie P.** (2010). Acute effect of a dual ETA-ETB receptor antagonist on pulmonary arterial vasculature in preterm lamb fetuses with surgically induced diaphragmatic hernia. *Pediatr.Surg.Int.*
251. **Stevenson RD and Allaire JH.** (1991). The development of normal feeding and swallowing. *Pediatr.Clin.North Am.* 38: 6: 1439-1453.
252. **St-Hilaire M, Duvareille C, Avoine O, Carreau AM, Samson N, Micheau P, Doueik A and Praud JP.** (2010). Effects of postnatal smoke exposure on laryngeal chemoreflexes in newborn lambs. *J.Appl.Physiol.* 109: 6: 1820-1826.
253. **Sumi T.** coordination of neural organization of respiration and deglutition: its change with postnatal maturation. In: *development of upper respiratory anatomy and function*, edited by Bosma JS, J.1975, p. 145-159.
254. **Sumi T.** (1967). The nature and postnatal development of reflex deglutition in the kitten. *Jpn.J.Physiol.* 17: 2: 200-210.
255. **Sun MK and Reis DJ.** (1994). Hypoxia selectively excites vasomotor neurons of rostral ventrolateral medulla in rats. *Am.J.Physiol.* 266: 1 Pt 2: R245-56.
256. **Taylor NC, Li A and Nattie EE.** (2005). Medullary serotonergic neurones modulate the ventilatory response to hypercapnia, but not hypoxia in conscious rats. *J.Physiol.* 566: Pt 2: 543-557.
257. **Taylor NC, Li A and Nattie EE.** (2005). Medullary serotonergic neurones modulate the ventilatory response to hypercapnia, but not hypoxia in conscious rats. *J.Physiol.* 566: Pt 2: 543-557.

258. **Tolcos M, McGregor H, Walker D and Rees S.** (2000). Chronic prenatal exposure to carbon monoxide results in a reduction in tyrosine hydroxylase-immunoreactivity and an increase in choline acetyltransferase-immunoreactivity in the fetal medulla: implications for Sudden Infant Death Syndrome. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 59: 3: 218-228.
259. **Travers JB and Norgren R.** (1983). Afferent projections to the oral motor nuclei in the rat. *J.Comp.Neurol.* 220: 3: 280-298.
260. **Wailoo MP and Emery JL.** (1982). Normal growth and development of the trachea. *Thorax* 37: 8: 584-587.
261. **Wang JS, Lin HY, Cheng ML and Wong MK.** (2007). Chronic intermittent hypoxia modulates eosinophil- and neutrophil-platelet aggregation and inflammatory cytokine secretion caused by strenuous exercise in men. *J.Appl.Physiol.* 103: 1: 305-314.
262. **Widdicombe J.** (2001). Airway receptors. *Respir.Physiol.* 125: 1-2: 3-15.
263. **Widdicombe J and Singh V.** (2006). Physiological and pathophysiological down-regulation of cough. *Respir.Physiol.Neurobiol.* 150: 2-3: 105-117.
264. **Wielkoszynski T, Kalita B, Paluch M, Opara M, Pluszczyk M, Obuchowicz A, Wilczynski M, Slimok M and Sikora A.** (2006). The assessment of urinary nicotine metabolites concentration in children and teenagers with oesophagitis]. *Przegl.Lek.* 63: 10: 911-913.
265. **Wilson SL, Thach BT, Brouillette RT and Abu-Osba YK.** (1981). Coordination of breathing and swallowing in human infants. *J.Appl.Physiol.* 50: 4: 851-858.
266. **Winickoff JP, Friebely J, Tanski SE, Sherrod C, Matt GE, Hovell MF and McMillen RC.** (2009). Beliefs about the health effects of "thirdhand" smoke and home smoking bans. *Pediatrics* 123: 1: e74-9.
267. **Winter SM, Fresemann J, Schnell C, Oku Y, Hirrlinger J and Hulsmann S.** (2009). Glycinergic interneurons are functionally integrated into the inspiratory network of mouse medullary slices. *Pflugers Arch.* 458: 3: 459-469.
268. **Wintour EM, Barnes A, Brown EH, Hardy KJ, Horacek I, McDougall JG and Scoggins BA.** (1978). Regulation of amniotic fluid volume and composition in the ovine fetus. *Obstet.Gynecol.* 52: 6: 689-693.
269. **Zhang M, Wang YT, Vyas DM, Neuman RS and Bieger D.** (1993). Nicotinic cholinceptor-mediated excitatory postsynaptic potentials in rat nucleus ambiguus. *Exp.Brain Res.* 96: 1: 83-88.